

ANAEROBE VERGÄRUNG VON FRUCTOSE MIT METHANOGENEN MISCHKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

ALBIN CHRISTIAN DUBACH

von Sursee und Ruswil (LU)

Begutachtet von

Prof. Dr. R. Bachofen

Zürich 1987

Zentralstelle der Studentenschaft

ANAEROBE VERGÄRUNG VON FRUCTOSE MIT METHANOGENEN MISCHKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

ALBIN CHRISTIAN DUBACH

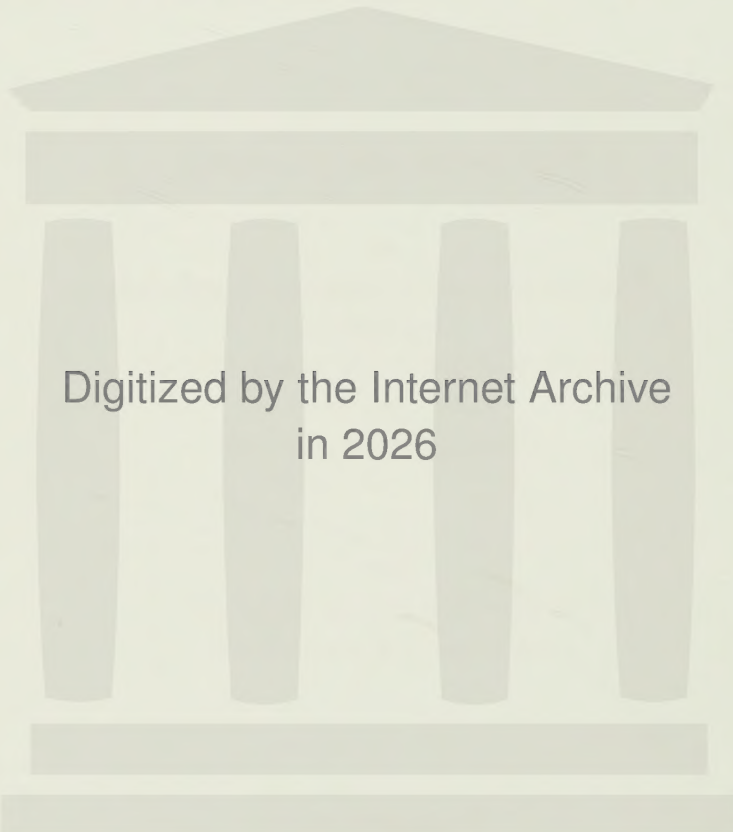
von Sursee und Ruswil (LU)

Begutachtet von

Prof. Dr. R. Bachofen

Zürich 1987

Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507228_0026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung und Versuchsprogramm	6
3. Material und Methoden	11
3.1. Organismen	11
3.2. Medien	11
3.3. Kultivation	14
3.4. Messungen	17
3.5. Berechnungen	22
4. Resultate	24
4.1. <i>Acetobacterium woodii</i> in Monokultur	24
4.2. Die methanogenen Bakterien in Monokultur	34
4.3. Mischkulturen	44
5. Diskussion	54
6. Zusammenfassung	62
7. Anhang	64
8. Literaturverzeichnis	66
9. Verdankungen	76
CURRICULUM VITAE	

1. EINLEITUNG

Das Kohlenstoffgerüst von organischem biologischem Material wird von Bakterien aerob zu Kohlendioxid und anaerob zu Methan und Kohlendioxid mineralisiert. Methanbildung wird in natürlichen Habitaten beobachtet, zum Beispiel in Sümpfen, See- und Meeressedimenten, im Pansen von Wiederkäuern, im Darmtrakt verschiedener Tiere (zum Beispiel Termiten, Fische oder Schafe) und des Menschen, aber auch im Zellinnern von eukaryotischen Einzellern. Neben den natürlichen Standorten findet die Methangärung auch in Faultürmen, Jauchegruben und Abfalldeponien statt (Zinder 1984, Van Bruggen 1985).

Im 18. Jahrhundert beschrieb der Physiker Alessandro Volta Lichter in Sümpfen, welche er als "brennende Luft" bezeichnete. Damit weckte er das wissenschaftliche Interesse für die Methanbildung. Nach den vorerst phänomenologischen Beschreibungen begann am Ende des 19. und zu Beginn des 20. Jahrhunderts die eigentliche Erforschung der mikrobiellen Methanbildung durch Béchamp, Mazé (zitiert bei Zehnder 1978, Wolfe 1979), Hoppe - Seyler (1876, 1877, 1887), Soehngen (1906) und Omelianskii (1916). Erste Versuche zur Anreicherung und Isolierung von Methanbakterien wurden von Barker (1936, 1940, 1956), Kluver (1947) und Schnellen (1947) unternommen. Die in dieser Zeit angewandte mikrobielle Technik, im Besonderen die Anaerobentechnik, war im Vergleich zu heute noch wenig entwickelt. Die Kultivationsmethode für anaerobe Reinkulturen wurde von Hungate (1969) verbessert und zur Standardmethode für die anaerobe Kultivation, zur sogenannten Hungate - Technik, entwickelt. Weitere Verbesserungen betrafen die Entwicklung von grösseren Kultivationsgefässen und von Begasungsanlagen, sowie die Anwendung neuentwickelter gasdichter Werkstoffe (Bryant 1972).

Es gelang in der Folge, den anaeroben Abbau organischen Materials zu Methan intensiv zu ergründen (Wolfe & Higgins 1979, Mah 1981, 1982, Taylor 1982). Vorerst wurde ein **Habitattyp A** beschrieben, der in aquatischen Sedimenten, Torfmooren, der Tundra, zerfallendem Kernholz und Faultürmen vorkommt. Arten der Gattungen *Clostridium*, *Bacteroides* und *Eubacterium* (sogenannte Organismen der Gruppe I, siehe Figur 1) spalten die Polymere (Kohlenhydrate, wie z. B. Cellulose) über Monomere zu C_1 bis C_5 Fettsäuren, CO_2 und H_2 . Die niederen Fettsäuren werden durch die sogenannten obligat Protonen reduzierenden Arten (Organismen der Gruppe II, wie *Syntrophomonas*,

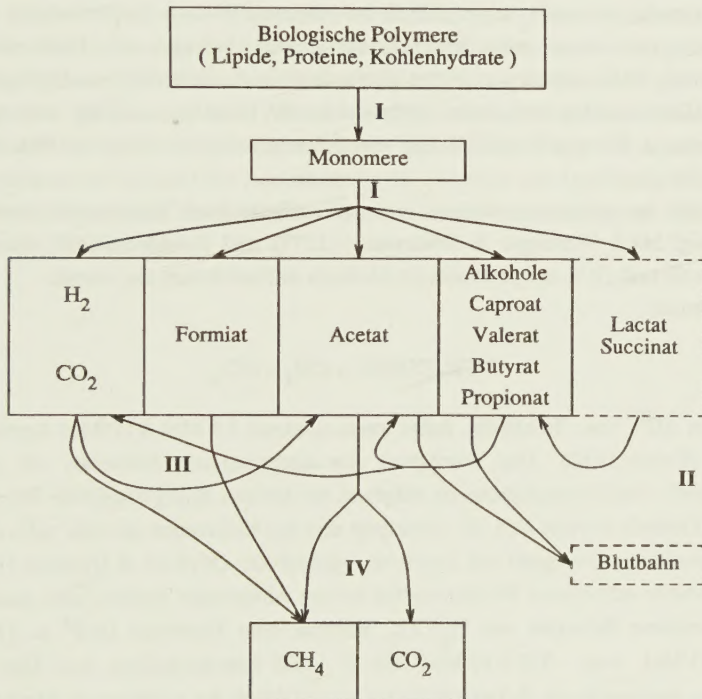
Synthrophobacter) weiter zu Acetat, Formiat, CO_2 und Wasserstoff abgebaut. Die methanogenen Bakterien (Organismen der Gruppe IV) verwenden diese Produkte als Substrat (siehe **Figur 1**) und bilden daraus Methan und Kohlendioxid.

Im zweiten, sogenannten **Habitattyp B**, vorherrschend im Pansen und Darm, vollzieht sich die Spaltung zu Monomeren und Fettsäuren gleich wie in Habitattyp A. *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* und *Bacteroides* -Arten (Gruppe I) bilden Fettsäuren, welche von der Magen- oder Darmwand resorbiert und in die Blutbahn abgegeben werden. Für die Methanogenese stehen deshalb nur Formiat, Kohlendioxid und Wasserstoff zur Verfügung. Die Organismen der Gruppe II wandeln die verschiedenen auftretenden Produkte, wie z. B. Lactat und Succinat, in Propionat um. Propionat gelangt dann ebenfalls in die Blutbahn. Im dritten **Habitattyp C**, in Thermalquellen oder besonderen Seen (Bsp. Lake Kivu, *Leigh et al. 1981*) vorkommend, liegen keine Polymerenstufen vor. Wasserstoff und CO_2 werden geochemisch erzeugt und entweder direkt oder über Acetat, welches durch die Gruppe der Acetogenen (als Organismen der Gruppe III bezeichnet, Beispiel *Acetobacterium*) gebildet wird, zu Methan und Kohlendioxid umgesetzt.

Der anaerobe Abbau setzt sich damit aus einer dreistufigen Gärung zusammen. In der fermentativen Stufe werden die polymeren Substrate, wie z. B. Kohlenhydrate, Fette oder Proteine, zu Monomeren, Fettsäuren, Kohlendioxid, H_2 und NH_3 abgebaut. Die folgende acetogene Stufe bildet aus den längerkettigen Fettsäuren Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff. Die Produkte der zweiten Stufe werden schliesslich durch die Methanbakterien zu Methan und Kohlendioxid umgesetzt (*Wolfe 1979*).

Die Freisetzung von H_2 während des Abbaus der Fettsäuren bewirkt bei den obligat Protonen reduzierenden Bakterien eine Hemmung des Abbaus und damit des Wachstums. Die fettsäureabbauenden Bakterien sind deshalb auf methanogenene Bakterien oder Sulfatreduzenten als wasserstoffzehrende Begleitorganismen zwingend angewiesen. Die Übertragung von Wasserstoff von einer Art zur Anderen wurde als *interspecies hydrogen transfer* bezeichnet (*Iannotti et al. 1973, Wolin 1982, Wolin & Miller 1982*). Bekanntestes Beispiel dafür ist das von H. A. Barker (1940) als Reinkultur isolierte Bakterium *Methanobacterium omelianskii*, welches sich als Mischkultur von *Methanobacterium bryantii* M. o. H. und einem als "S - Organismus" bezeichneten Bakterium erwies (*Bryant et al. 1967*). Der "S - Organismus" oxidiert Äthanol zu Acetat und H_2 , wächst aber in Monokultur nur schwach, da der gebildete Wasserstoff die Oxidationsreaktion hemmt. Das Bakterium konnte mit Äthanol als Kohlenstoff- und

Energiequelle nie in Reinkultur erhalten werden. Es wächst mit *Methanobacterium bryantii* in Cokultur auf Äthanol und CO_2 , wobei das Methanbakterium den gebildeten Wasserstoff durch Bildung von Methan entfernt.



Figur 1: Vereinfachtes Schema des anaeroben Abbaus von Polymeren zu Methan und Kohlendioxid und der beteiligten Organismengruppen. **I** Fermentierer, **II** obligat Protonen reduzierende Bakterien, **III** *Acetobacterium*, **IV** Methanogene (nach Wolfe & Higgins 1979).

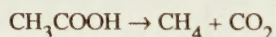
Die als syntrophe Assoziationen, eine Spezialform des Mutualismus (Harrison 1978), bezeichneten Mischkulturen, haben folgende Eigenschaften: es werden weniger "reduziertere" Produkte wie Succinat, Lactat, Äthanol, Propionat und Butyrat gebildet und dafür mehr "oxidiertere" Produkte, hauptsächlich Essigsäure, ausgeschieden. Der neben Kohlendioxid gebildete Wasserstoff dient der Methanogenese oder bei

genügendem Sulfatangebot der Sulfatreduktion. Die Entfernung des Wasserstoffes durch Bildung von Methan oder Schwefelwasserstoff verursacht eine Verschiebung der Gärbilanz und ermöglicht eine vollständige Mineralisation (Abram & Nedwell 1978).

Fermentative Bakterien sind nicht auf wasserstoffzehrende Begleitorganismen angewiesen. Sie setzen H_2 nicht obligat frei, denn sie können Verbindungen, wie z. B. Fettsäuren, reduzieren oder besitzen oft keine Hydrogenase. Fermentierer, die Hydrogenase bilden, können vermehrt Wasserstoff in Anwesenheit von Methanbakterien oder Sulfatreduzenten freisetzen, wobei sich die Gärbilanz, analog zur syntrophen Mischkultur, z. B. zum Produkt Acetat statt Äthanol verschiebt (Winter 1980, McInerney et al. 1979).

Acetat hat im anaeroben Abbau demnach neben dem Wasserstoff eine zentrale Bedeutung. Nach Wellinger & Wuhrmann (1977) und Zehnder (1978) stammt z. B. zwischen 60 und 70 % des produzierten Methans in Faultürmen aus Acetat.

Die Reaktion:



ergibt ein $\Delta G^{0'}$ von -36 kJ/Mol, dabei kann maximal 1.1 Mol ATP/Mol Acetat gebildet werden (Taylor 1982). Das Wachstum von methanogenen Bakterien mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle ist aufgrund der kleinen Energieausbeute des Substrates gering. Deshalb erweist sich die Isolierung und die Kultivierung als sehr schwierig. Man experimentierte vorwiegend mit Anreicherungskulturen (Mylroie & Hungate 1954, Smith 1966), welche schnelleres Wachstum und höhere Abbauraten zeigten, oder man wählte auf energiereichere Substrate wie H_2/CO_2 , Formiat oder Methanol ($\Delta G^{0'} = -131$ kJ/Mol, -136.9 kJ/Mol, resp. -319.8 kJ/Mol) als C- und Energiequellen aus. Die Zahl der isolierten methanogenen Bakterienstämme wuchs durch die verbesserten Methoden stetig an. Heute existieren bereits über 100 Stämme in Reinkulturen (Dubach & Bachofen 1985). Neben Studien an Anreicherungskulturen verschiedenster Herkunft kommt solchen an definierten Mischkulturen immer mehr Bedeutung zu, denn die sehr komplexen Vorgänge der anaeroben Mineralisation lassen sich mit Mischkulturen bekannter Organismen besser analysieren (Winter 1980). Das Schwergewicht der Forschung an syntrophen Mischkulturen lag in der Untersuchung der Umwandlung von Monomeren, Fettsäuren und Alkoholen. Die Übertragung des Wasserstoffes und dessen Einfluss auf die Gärungsbilanzen standen im Vordergrund des Interesses (Winter & Wolfe 1980). Die vollständige Mineralisation, d. h. auch der Abbau des Acetates (siehe

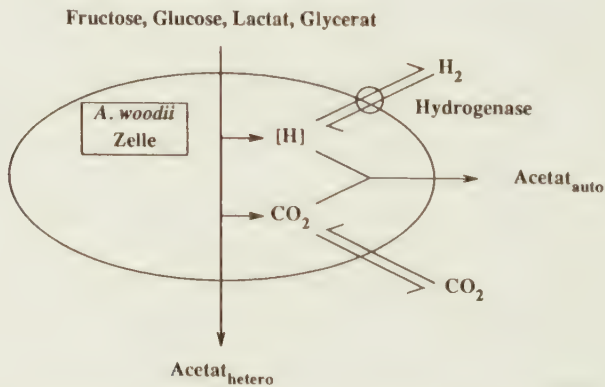
Figur 1), wurde weniger betrachtet; hauptsächlich interessierten die auftretenden Zwischenprodukte.

Monomere Bausteine (wie z. B. Glucose, Fructose) können nur von wenigen Arten der Gattungen *Acetobacterium* und *Clostridium* in einer Homoacetatgärung zu Acetat als einzigem Produkt umgesetzt werden (Braun & Gottschalk 1981). Mischkulturen von acetogenen Bakterien mit acetatverwertenden Methanbakterien ermöglichen eine vollständige Mineralisation von monomeren Kohlenhydraten (Winter & Wolfe 1979). Da der Hauptanteil des Methans beim Abbau von organischem Material aus Acetat stammt, lag das Interesse der vorliegenden Arbeit in der Untersuchung des Umsatzes von Kohlenhydraten, am Beispiel der Acetatbildung aus Fructose mit *Acetobacterium woodii*, und in der Beschreibung des Umsatzes von Acetat durch methanogene Bakterien zu Methan und Kohlendioxid.

2. PROBLEMSTELLUNG und VERSUCHSPROGRAMM

a) Kultivation von *Acetobacterium woodii*

Acetobacterium woodii ist ein strikt anaerobes, ovales, kurzes Stäbchen von 1 - 2 μm Länge und einem Durchmesser von 1 μm . Das Bakterium ist grampositiv, besitzt 1 - 2 subterminale Geisseln und ist beweglich. *A. woodii* bildet keine Endosporen. Es wurde aus marinen Sedimenten isoliert (Balch *et al.* 1977) und in die Familie der *Propionibacteriaceae* eingeteilt, ist aber aufgrund der 16S rRNA Sequenzhomologie - Vergleiche eng verwandt mit einigen *Clostridium* - Arten (Tanner *et al.* 1982). Das Bakterium wächst zwischen 30 - 40 °C optimal. Die DNA - Basenzusammensetzung beträgt 39 mol% Guanin + Cytosin. *A. woodii* kann sowohl auto- als auch heterotroph wachsen und benötigt nur Pantothensäure als essentielles Vitamin. Autotroph produziert es aus Wasserstoff und Kohlendioxid als Energie- und Kohlenstoffquelle Essigsäure. Heterotroph verwertet es Fructose, Glucose, Lactat und Glycerat in einer Homoacetatgärung zu Acetat (Siehe Figur 2).



Figur 2: Substratspezifität von *Acetobacterium woodii*. Acetat_{hetero}: heterotroph gebildetes Acetat; Acetat_{auto}: autotroph gebildetes Acetat (nach Braun 1979).

Analog zu den methanogenen Bakterien zeigt auch *A. woodii* eine ausgeprägte Abhängigkeit des Wachstums ($0.45 \mu\text{Mol/gTG}$) und der Acetatbildung von Nickel (Diekert et al. 1982). In CO_2 - freien Medien hemmt der gebildete Wasserstoff, 0.1 Mol H_2 pro Mol Substrat, bei Partialdrucken von über 0.02 atm den Fructoseabbau und das Wachstum (Braun 1979).

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, *Acetobacterium woodii* im Fermenter unter pH-, redox- und temperaturkontrollierten Bedingungen zu züchten. Das Schwergewicht lag in der Untersuchung der Produktionsraten von Acetat und der Verbrauchsdaten von Fructose in Batch- und kontinuierlicher Kultur bei verschiedenem pH und verschiedener Temperatur.

b) Kultivation von methanogenen, acetatverwertenden Bakterien

Die methanogenen Bakterien gehören zu den Archaeobakterien und zeichnen sich neben der Produktion von Methan durch besondere physiologische und biochemische Eigenheiten aus. So besitzen sie zum Beispiel keine Mureinzellwand, haben als Lipide Isopranylglycerinäther und verfügen im Stoffwechsel über einige besondere Faktoren (Coenzym M, Faktor F420 und F430, Methanopterin, Methanofuran, Methanophosphagen usw.). Sie weisen in bezug auf Morphologie, DNA - Basenzusammensetzung und optimaler Temperatur eine grosse Variabilität auf. Hingegen ist das Substratspektrum mit H_2/CO_2 , CO, Formiat, Methanol, Acetat und Methylaminen eng begrenzt (Balch et al. 1979, Vogels et al. 1984, Dubach & Bachofen 1985).

Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle wird nur von Arten der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanothrix* verwertet und dabei zu äquimolaren Mengen an CO_2 und CH_4 umgesetzt. Eine Übersicht gibt **Tabelle 1** (nach Dubach & Bachofen 1985) wieder.

Species	Substrat	Morphologie	Gram	Temperatur	Gen. Zeit	Mol %G+C	pH
<i>M'thrix soehngenii</i> Opfikon	-	Stäbchen	-	37	3.5 d	51.9	7.0
<i>M'thrix soehngenii</i> VNBF	-	Stäbchen	-	40	23 h	NB	7.0
<i>M'thrix thermoacetophila</i> Z-517	-	Stäbchen	-	65	NB	NB	NB
<i>M'thrix concilii</i> GP6	1	Stäbchen	-	35-40	24 h	61.25	7.1-7.4
<i>M' sarcina barkeri</i> MS	2-5	Sarcina	+	40	12 h	38.8	7.0
<i>M' sarcina barkeri</i> 227	2-5	Sarcina	+	35	24 h	38.8	7.0
<i>M' sarcina acetivorans</i> C2A	3-5	Sarcina	-	35-40	5.2 h	41.0	6.5-7.0
<i>M' sarcina mazei</i> S-6	3,4	Coccoid	-/+	30-40	7.7 h	NB	6.1-8.0
<i>M' sarcina mazei</i> MC ₃	3,4	Coccoid	-	25-40	37 h	NB	6.0-7.7
<i>M' sarcina vacuolata</i> Z	3-5	Sarcina	+	18-45	NB	51	6.0-8.0
<i>M' sarcina thermophila</i> TM1	3,4	Sarcina	+	45-55	5 h	42	6.0-7.0

Tabelle 1: Physiologische Daten von methanogenen Acetatverwertern. *M'* = *Methano*; Substratcode, alle wachsen auf Acetat dazu 1: mit CO₂ zusammen, 2: H₂/CO₂, 3: Methanol, 4: Methylamine, 5: CO; NB: Nicht bestimmt.

Ausser *Methanosarcina barkeri* und *Methanosarcina vacuolata* sind alle aufgeführten Methanbakterien nicht fähig, auf H₂/CO₂ als C - und Energiequelle zu wachsen. Die Arten der Gattung *Methanosarcina* vermögen zudem, Methanol, Methylamine oder auch CO zu Methan umzusetzen. Ihre morphologischen Formen bestehen aus Sarcina oder sarcinaähnlichen Typen von unterschiedlicher Gramfärbung. Einheitliche Morphologie zeigt sich in der *Methanothrix* Gattung. Die Bakterien sind stäbchenförmig und gramnegativ.

Das Temperaturspektrum zeigt bei beiden Gattungen mesophile Arten und je eine thermophile Species. Die Verdopplungszeiten betragen bei der Gattung *Methanothrix* zwischen 23 Stunden und 3.5 Tagen, bei den *Methanosarcina* - Arten liegen diese Zeiten aufgrund der besseren Energieausbeute der Substrate Wasserstoff und Kohlendioxid, Methanol oder Methylamine zwischen 5 und 37 Stunden. Die Zusammensetzung der DNA erreicht bei den *Methanothrix* - Arten Werte über 51 Mol% G + C, während bei der *Methanosarcina* Gattung ein Bereich zwischen 38.8 und 51 Mol% G + C bestimmt wurde. Die *Methanothrix* - Arten sind alle neutrophil, einige *Methanosarcina* - Arten können auch noch bei pH 6 oder 8 wachsen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, acetatverwertende Methanbakterien im Fermenter zu züchten. Das Hauptanliegen lag dabei im Erreichen einer kontinuierlichen Kultur, welche über längere Zeiträume stabil bleiben sollte.

c) Mischkulturen

Definierte Mischkulturen ermöglichen vertiefte Kenntnisse über die Interaktionen zweier oder mehrerer Bakterienarten. Die Mischkultivation mit Fermentierern und Methanogenen wurde bisher in der Regel in Flaschen oder Hungaterörchen durchgeführt, wo konstante pH- oder Redoxbedingungen nicht einzuhalten sind (Wolfe & Higgins 1979, Winter 1980, Taylor 1982). Es gelang erst in wenigen Fällen, Mischkulturen im Fermenter unter kontrollierten pH - Bedingungen zu züchten (Capenberg 1975, Rose & Pirt 1979, Winter 1980).

Fermenterkultivation ist ein Standardverfahren bei der Untersuchung des Abbaus komplexer organischer Substrate wie zum Beispiel industrieller Abwässer, wo mit angereicherten Kulturen Studien über Abbauraten betrieben wurden (Andrews & Graef 1971, Lawrence 1971, Hansson & Molin 1981, Wolin 1982, Boone 1984, Klass 1984, Daniels 1984). Der begrenzende Schritt in der Geschwindigkeit des Abbaus organischen Materials liegt nach Mah & Smith (1981) und Vogels & Vissier (1983) in den geringen Wachstums- und Umsatzraten der beteiligten methanbildenden Partner.

Es war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, Mischkulturen im Fermenter unter temperatur-, pH- und redoxkontrollierten Bedingungen anaerob zu züchten. Die Bestimmung der Abbauraten von Fructose und Acetat, wie auch die Bestimmung der Produktionsraten von Methan, standen in Vordergrund. Eine stabile Mischkultur mit maximaler Methanproduktion sollte in kontinuierlicher Kultur erreicht werden.

d) Allgemeines Vorgehen

Um diese oben formulierten Ziele zu erreichen, mussten die bestehenden Anlagen und Geräte verbessert und ausgebaut werden. Die Arbeiten hatten folgenden Ablauf:

- Bau eines Hungate Ofens zur vollständigen Sauerstoffentfernung der Gase.
- Bau von Geräten zur Messung und Regelung des Redoxpotentials.

- Bau von Geräten zur Regelung der Begasungsrate und zur Messung der Gasaustrittsrate.
- Anpassung der Messgeräte zur Datenerfassung mit Rechner.
- Kultivation von *Acetobacterium woodii* im Fermenter.
- Isolation und Kultivation von *Methanosarcina barkeri* 227, *Methanosarcina* Stamm JKAD und DAL5 in Flaschen mit verschiedenen Medien.
- Evaluation eines Mediums für *A. woodii* in Mischkultur mit *Methanosarcina barkeri* 227 oder *Methanosarcina* Stamm JKAD oder DAL5 in Flaschen.
- Kultivation von *Methanosarcina barkeri* 227, *Methanosarcina* Stamm JKAD und DAL5 im Fermenter.
- Installation eines IR - Analysators zur kontinuierlichen Bestimmung der Methankonzentration im austretenden Gas.
- Entwicklung verbesserter Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren, von Biomasse und von Fructose.
- Erweiterung der Gasumschaltanlage zur alternierenden Messung von zwei Gasen mit dem IR - Analysator und der Steuerung durch einen Rechner.
- Kultivation von *A. woodii* in Mischkultur mit *Methanosarcina* Stamm JKAD oder DAL5 im Fermenter.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Organismen

Acetobacterium woodii WB1 und *Methanosarcina barkeri* 227 erhielt ich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ 1030, respektive DSM 1538). Eine methanogene Kultur, mit *Methanosarcina* Stamm JKAD bezeichnet, stammte aus Zürichseesediment. Eine Sedimentprobe aus dem Sempachersee (Kanton Luzern) stellte mir die Firma Osmoplan AG, Sursee zur Verfügung. Aus dieser Probe isolierte ich eine weitere methanogene Kultur. Die Kultur erhielt die Bezeichnung *Methanosarcina* Stamm DALS.

3.2. Medien

Die Züchtung von Vorkulturen von *Acetobacterium woodii* WB1 und *Methanosarcina barkeri* 227 erfolgte in Flaschen. Folgende Bezeichnungen wurden verwendet: Medium OA für *A. woodii* (nach Balch et al. 1977) und Medium OM für *M. barkeri* (nach Mah et al. 1978, siehe Tabelle 2). Für Flaschen- und Fermenterkulturen verwendete ich nach verschiedenen Tests (siehe Resultate) zwei weitere Medien, als DM (nach Dubach 1981) und SM - Medium (nach Scherer & Sahn 1979, 1981 und 1982, siehe Tabelle 3) bezeichnet, für *A. woodii*, *M. barkeri* 227, *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS.

Kohlenstoff- und Energiequellen waren:

D(-) - Fructose, 3 - 8 g/l (16.7 - 44.4 mM) Endkonzentration im Medium für Monokulturen von *A. woodii* und für die Mischkulturen.

Acetat als Natrium-, Kalziumsalz oder als Essigsäure für alle methanogenen Kulturen in einer Endkonzentration im Medium von 50 - 150 mM.

Substanz	OA-Medium			OM-Medium		
	Stammlösung		Endkonzentration	Stammlösung		Endkonzentration
<i>I. Puffer</i>	g/l	mM	mM	g/l	mM	mM
KH_2PO_4	0.4	2.94	2.87	-	-	-
K_2HPO_4	0.4	2.3	2.2	0.408	2.3	2.2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	5.79	40.8	37.7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.41	0.4	-	-	-
NaHCO_3	2.0	23.8	23.3	-	-	-
NH_4Cl	1.0	18.6	18	1.02	19	17.6
<i>II. Mineralsalze</i>	-	-	-	g/l	mM	mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	10.0	68	0.63
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	10.0	49.1	0.45
<i>III. Spuren</i>	g/l	mM	μM	-	-	-
AlCl_3	0.01	0.075	0.75	-	-	-
CaCl_2	0.1	0.68	6.8	-	-	-
CoCl_2	0.1	0.42	4.2	-	-	-
CuSO_4	0.01	0.063	0.63	-	-	-
FeSO_4	0.1	0.66	6.6	-	-	-
H_3BO_3	0.01	0.16	1.6	-	-	-
MnSO_4	0.5	3.31	33.1	-	-	-
Na_2MoO_4	0.01	0.041	0.41	-	-	-
NTA	1.5	7.3	73.0	-	-	-
ZnSO_4	0.1	0.62	6.2	-	-	-
<i>IV. Vitamine</i>	mg/l	mM	μM	-	-	-
Ca-Pantothenat	50.0	0.11	0.11	-	-	-
<i>V. Schwefel</i>	g/l	M	mM	g/l	mM	mM
Cystein-HCl	50.0	0.285	2.85	-	-	-
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50.0	0.209	2.09	10.0	41.6	0.38
Präparation (Stickstoff- begasung)	969 ml Lösung I + 10 ml Lösung III + 1 ml Lösung IV wurden bei pH 6.2 autoklaviert und danach begast. Dann wurde 10 ml Lösung V und 10 ml Fructoselösung (siehe Text) steril zugegeben und erneut begast.			970 ml Lösung I + 10 ml Lösung II wurden bei pH 6.2 autoklaviert und danach begast. Dann wurde 10 ml Lösung V und 10 ml Acetatlösung (siehe Text) steril zugegeben und erneut begast.		

Tabelle 2: Medienzusammensetzung und Präparation von OA - und OM - Medium.

Substanz	DM-Medium			SM-Medium		
	Stammlösung		Endkonzentration	Stammlösung		Endkonzentration
<i>I. Puffer</i>	g/l	mM	mM	g/l	mM	mM
Imidazol-HCl	-	-	-	6.8	100	10
KH ₂ PO ₄	2.72	20	19.4	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	-	-	0.78	5	0.5
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	-	-	-	0.89	5	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	0.68	0.63	2.94	20	2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	0.49	0.48	4.07	20	2
NH ₄ Cl	1.0	18.6	18	5.35	100	10
<i>II. Mineralsalze</i>	-	-	-	g/l	mM	mM
KCl	-	-	-	3.73	50	5
NaCl	-	-	-	19.87	340	34
NaHCO ₃	-	-	-	4.2	50	5
<i>III. Spuren</i>	g/l	mM	µM	g/l	mM	µM
AlCl ₃	0.067	0.052	0.49	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.476	2	1.94	0.238	1	1
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.085	0.5	0.48	0.003	0.017	0.017
H ₃ BO ₃	0.1	1.62	1.62	0.062	1	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.2	1.01	1.01	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.049	0.2	0.19	0.121	0.5	0.5
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.237	1	0.97	1.18	5	5
NTA	2.87	15	15	-	-	-
ZnCl ₂	0.84	6.16	6	-	-	-
NaCl	11.7	200	190	-	-	-
<i>IV. Vitamine</i>	mg/l	mM	µM	mg/l	mM	µM
Ca-Pantothenat	50	0.11	0.11	5	0.11	0.11
Riboflavin	-	-	-	1130	2.2	22
Folsäure	-	-	-	441	1	10
Biotin	-	-	-	20	0.082	0.82
Pyridoxal-HCl	-	-	-	10	0.049	0.49
Nicotinsäure	-	-	-	5	0.041	0.41
Vitamin B ₁₂	-	-	-	0.1	0.0007	0.07
p-Aminobenzoat	-	-	-	5	0.036	0.36
<i>V. Eisen</i>	g/l	mM	µM	g/l	mM	µM
FeCl ₂ ·4H ₂ O	2	10	9.8	-	-	-
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	-	-	-	0.392	1	1
<i>VI. Schwefel</i>	g/l	mM	mM	g/l	mM	mM
a: Cystein-HCl	50	285	2.78	50	285	0.85
b: Na ₂ S·9H ₂	50	208	2.03	50	208	0.3
<i>VII. Redox</i>					mM	mM
Ti(III)citrat ₂					9	0.18
Präparation (Stickstoff- begasung)	977 ml Lösung I + 1 ml Lösung III + 1 ml Lösung IV + 1 ml Lösung V wurden bei pH 6.1 autoklaviert und danach begast. Dann wurde 10 ml Lösung VI und 10 ml Fructose- oder 10ml Acetalösung (siehe Text) steril zugegeben und erneut begast.			754 ml dest. Wasser + 100 ml Lösung I + 100 ml Lösung II + 1 ml Lösung III + 10 ml Lösung IV + 1 ml Lösung V wurden bei pH 6.2 - 6.4 autoklaviert und danach begast. Dann wurde 2.7 ml Lösung VIa, 1.4 ml Lösung VIb, 20 ml Lösung VII und 10 ml Acetat- oder Fructoselösung (siehe Text) steril zugegeben und erneut begast.		

Tabelle 3: Medienzusammensetzung und Präparation von Medium DM und SM.

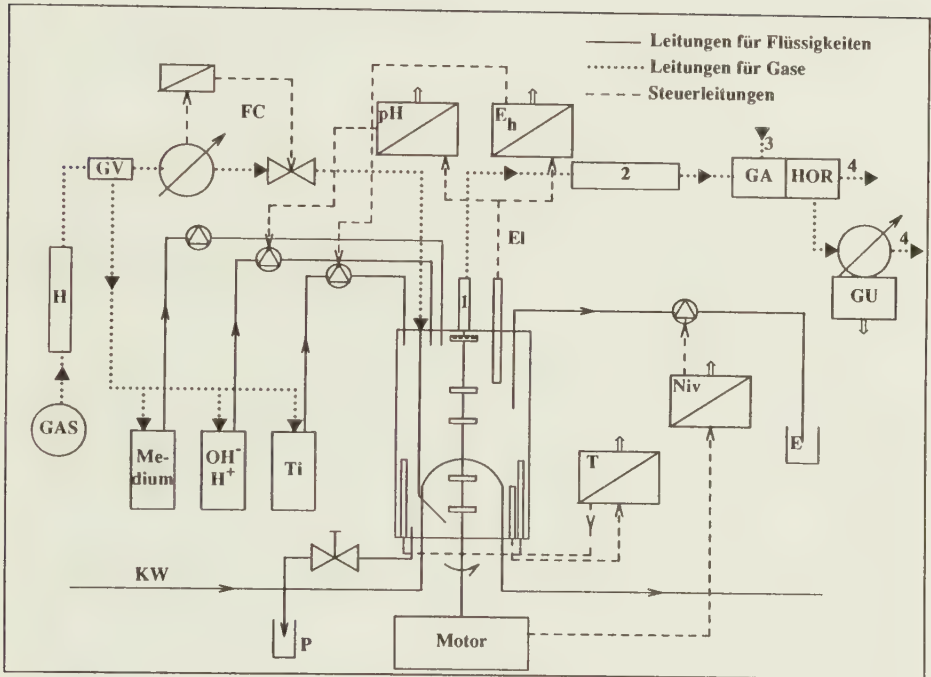
Die Zusammensetzung der Medien und deren Präparation sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Die Sterilisation der Kulturflaschen (100 ml Volumen) und der Vorratsflaschen (10 l Volumen) erfolgte während 20 Minuten bei einer Temperatur von 121 °C. Zur Begasung der autoklavierten Medien diente sauerstofffreier Stickstoff oder N_2/CO_2 (für Monokulturen in Flaschen). Die Dauer der Begasung betrug 15 - 30 Minuten mit einer Rate von 80-100 ml/min. Die nach der Begasung zugegebenen, separat sterilisierten Lösungen waren entweder autoklaviert (Schwefel-, Titan(III)citratlösung und C - Quellen) oder sterilfiltriert (Vitamin-, Cysteinlösung). Die Zugabe erfolgte mit sterilen Spritzen. Der pH wurde anschliessend mit steriler Natronlauge auf 6.8 - 7.2 eingestellt und das Medium nochmals während 1 - 2 Minuten mit N_2 begast.

Die Präparation von Titan(III)citratlösung wurde nach Zehnder & Wuhrmann (1976) und Wellinger & Wuhrmann (1977) durchgeführt. Im Verlaufe der Arbeit ersetzte amorphes Eisensulfid (nach Brock & O'Dea 1977), welches bessere Reduktionseigenschaften aufwies, das Titan(III)citrat. Bei der Präparation des Mediums in Vorratsflaschen fiel das amorphe Eisensulfid nach 2-3 Stunden aus. Die Partikelbildung hatte zur Folge, dass die Trockengewichtsbestimmung mit einem grösseren Fehler behaftet war.

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgte die Kultivation der methanogenen Organismen mit je 1 g/l Penicillin G und 1 g/l Streptomycin im Medium. *A. woodii* ist allerdings sensitiv auf diese Antibiotika. Daher musste die methanogene Kultur vor der Zugabe von *A. woodii* mit antibiotikafreiem Medium im Verhältnis von mindestens 1:5 (v/v) verdünnt werden.

3.3. Kultivation

Vorkulturen aller verwendeten Organismen wurden in 100 ml Schottflaschen mit Hungateaufsatz (Hungate 1969) bei 35 °C im Wärmeschrank wahlweise unter einer N_2/CO_2 (80:20% v/v) oder N_2 Atmosphäre unter einem Druck von 0.5 - 0.8 bar gezüchtet. Das Volumen betrug jeweils 30 - 50 ml Medium mit einem Inoculum von 5 - 10 % (v/v). Alle 3 - 5 Tage wurde die Gasphase ersetzt. Überimpfungen in frisches Medium erfolgten, sobald sich bei den methanogen Kulturen und Mischkulturen eine gesteigerte Methanproduktion zeigte. *A. woodii* wurde alle 2 - 4 Wochen oder nach Bedarf für die Fermenterkultivation überimpft.



Figur 3: Fermentationsanlage (nach Frischknecht 1978, Dubach 1981, Muster et al. 1983).

1: Rückflusskühler; 2: Trockenrohr mit Sulfidabsorption; 3: 2. Gaseintritt zur Gasumschaltanlage GA; 4: Gasaustritt; E: Kulturausfluss; E_h : Redoxregler; El: kombinierte pH/Redoxelektrode; FC: Regler der Begasungsrate; GA: Gasumschaltanlage für 2 Gasquellen (siehe Figur 4); GU: Gasuhr; GV: Gasverteilanlage für Fermenter oder Vorratsgefäße; H: Hungate - Ofen zur Sauerstoffentfernung von Gasen; HOR: Methan IR - Analysator; KW: Kühlwasser; Niv: Niveauregulierung; P: Probennahme; pH: pH - Regler; T: Temperaturregler mit einem Messfühler und 2 Heizstäben; Ti: Titan(III)citrat Puffer; $\uparrow, \downarrow$: Datentransfer zum Recorder oder Computer.

Batch- respektive Chemostatkultivationen wurden in einem 2 l-Fermenter (Schneider 1970, Frischknecht 1978, Dubach 1981, Muster et. al 1983, siehe Figur 3) durchgeführt.

Standardbedingungen waren pH 7.0, 37 °C, 1500 U/min und ein Kulturvolumen von 1.7 Liter. Die Begasungsraten mit sauerstofffreiem Stickstoff betrugen für *Acetobacterium woodii* zwischen 25 und 50 ml/min, für die methanogenen Kulturen und für die Mischkulturen 2 - 4 ml/min.

Für die pH - Regelung wurde 0.5 N sterile NaOH oder 0.2 N sterile HCl zugepumpt. Sterile Ti(III)citrat - Lösung wurde zur Redoxregelung eingesetzt.

Schlauchquetschpumpen (Cole-Parmer Masterflex 7013, 7016, Zivy AG, Basel und Watson Marlow MHRE 22, Skan AG, Basel) dienten zur Zudosierung von Flüssigkeiten. Transportleitungen waren Butylgummi- und Siliconschläuche (Masterflex Silicon oder Watson Marlow Butylgummi).

Die verschiedenen Gase wurden durch Kupferrohre ($\varnothing 4 \times 1$ mm), Nylonschläuche ($\varnothing 4 \times 1$ mm, Gummi Maag, Zürich) und Butylgummischläuche (Watson Marlow) geleitet. Zum Trocknen des austretenden Gases wurde nach dem Rückflusskühler ein Glasrohr ($\varnothing 2$ cm, Länge 29 cm) benutzt, welches als Wasser- und Sulfidindikator Blaugel, als Trocknungsmittel CaCl_2 und als Sulfidabsorptionsmittel $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (an Sägemehl aufgebracht, von der Kläranlage Werdhölzli, Zürich) enthält. Wasserstoff (Carbagas AG, Zürich; O_2 Gehalt < 5 ppm) und Kohlendioxid (O_2 Gehalt < 10 ppm) wurden als Gemisch (80 : 20 % v/v), Stickstoff (O_2 Gehalt < 10 ppm) einzeln zur Fermenterkultivation verwendet.

Die Reinigung zu einem Restsauerstoffgehalt < 0.1 ppm erfolgte mittels eines modifizierten Hungate - Ofens (Hungate 1969, Dubach 1981). Ein Kupferrohr (Aussendurchmesser 22 mm, Wandstärke 1.5 mm, Länge 500 mm) war mit Kupferspänen (Länge 1 - 3 mm, Breite 0.2 - 0.5 mm) gefüllt. Von aussen heizte ein Heizband (S25/50 Heräus Wittmann, Heidelberg BRD) das Rohr. Ein ebenfalls aussen anliegender Flachfühler (Eisenkonstantan TF/IG Heräus Wittmann) mass die Temperatur. Ein Regelgerät (TF400F/500 Heräus Wittmann) regelte die Temperatur auf 350 °C. Die effektive Sauerstoff - Bindungskapazität, ausgemessen mit einem O_2 - Analysator (Thermox Meter II, Thermolab Instruments, Pittsburg PA, USA), betrug 1.6 Liter O_2 , bei einer Oberflächenheizleistung des Hungate - Ofens von 0.83 W/cm^2 .

Alle verwendeten Chemikalien waren analysenrein und stammten von Fluka AG, Buchs oder Merck AG, Darmstadt, BRD.

3.4. Messungen

a) Kontinuierliche Messungen

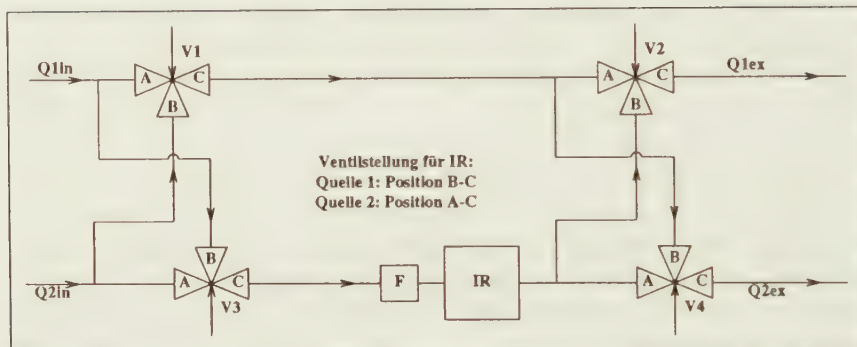
Mit einer kombinierte Elektrode (Pt 405-60-85, Dr. W. Ingold AG, Urdorf) und entsprechenden Messwertverstärkern (Knick 400 und 400R, Max Dietrich AG, Zürich) konnte der **pH** und das **Redoxpotential E_h** gleichzeitig gemessen werden. Die Regelung erfolgte mit einem Zweipunktregler (RO-2 BBC Goerz Metrawatt, Zürich), d. h. der Sollwert konnte von einer Seite her eingehalten werden.

Eine Pt100 Sonde erfasste die **Temperatur**. Bei einem konstanten Kühlwasserstrom steuerte ein Regler (RO-2 siehe oben) 2 Heizstäbe zu je 350 W an, damit die Temperatur konstant gehalten werden konnte.

Die **Gasaustrittsrate** wurde mit einem Gaszähler (L1CU Wohlgroth, Zürich), ausgerüstet mit einem opto-elektronischen Signalwandler, bestimmt.

Der Fluss des zugeführten Gases wurde mit einem Masseflusskontroller (FC260 Tylan, Eching, BRD) geregelt, wobei ein hydrophober Membranfilter (Gelman ACRO 50, Skan AG, Basel) zum Schutz vor Partikel und Wasser vor den Kontroller montiert wurde.

Ein Infrarotanalysator (PIR 2000, Horiba SA, Chavannes-de-Bogis) mass die **Methankonzentration** im austretenden Gas. Ein hydrophober Membranfilter (Gelman ACRO 50), dem IR - Analysator vorgeschaltet, diente zum Schutz vor Wasser und Partikeln. Das austretende Gas wurde über eine Gasumschaltanlage geleitet, damit die Methankonzentrationen aus zwei Kultivationen alternierend bestimmt werden konnten (siehe **Figur 4**). Die Steuerung erfolgte entweder manuell, über Schaltuhren oder durch den Rechner.



Figur 4: Gasumschaltanlage für alternierende Messung des Methangehaltes von zwei Gasquellen Q1 und Q2.

Q1in, Q2in: Einlass für Gasquelle 1 resp. 2; Q1ex, Q2ex: Auslass der Gasquellen 1 resp. 2; V1 - V4: pneumatische Ventile mit möglichen Ventilstellungen A→C oder B→C; F: Membranfilter; IR: Infrarot - Analysator für Methan.

Ein Punktdrucker (Transkomp 288, PR3500 Philips, Eindhoven NL) zeichnete die **Kultivationsparameter** pH, Redoxpotential E_h , Temperatur und die **Variablen** Gasfluss und Methankonzentration kontinuierlich auf. Diese Werte konnten auch mit einem Rechner (Motorola EXORcet 30, mit 8 Bit Prozessor, MBR Bio Reactor AG, Wetzikon) erfasst werden. Ein später eingesetzter, leistungsfähigerer Rechner (Eltec VEX111, mit 16 Bit Prozessor, Mainz BRD) ermöglichte neben der Datenerfassung auch gleichzeitig die Steuerung der Gasumschaltanlage (siehe **Figur 4**) und die Berechnung des Methanflusses. K. Schneider von unserem Institut entwickelte die Software für die beiden Computer.

b) Diskontinuierliche Messungen

Die diskontinuierlichen Messungen umfassten die **Substrat-** und **Produktkonzentrationen** in der flüssigen (Fructose, Fettsäuren C_1 bis C_5) und in der gasförmigen Phase (Methan, H_2 , CO_2), sowie die Bestimmung der **Biomasse**. Im Chemostatbetrieb erfolgte die Berechnung der Verdünnungsrate nach der Gleichung:

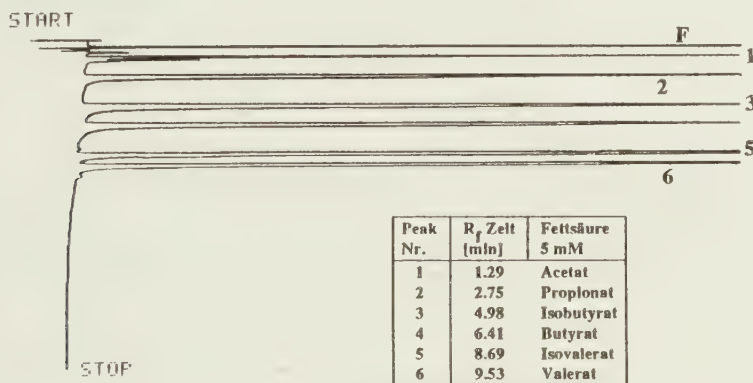
$$D = F/V \text{ [h}^{-1}\text{]}.$$

F ist der Fluss des Mediums, gemessen anhand des abgepumpten Kulturvolumens [l/h] und V das aktuelle Fermentervolumen [l].

Die löslichen **Fettsäuren** Acetat, Propionat, Isobutyrat, Butyrat, Isovalerat und Valerat konnten mittels Gas- oder Flüssigchromatographie bestimmt werden. Die Bedingungen für die Bestimmung im Gaschromatographen (Shimadzu GC-7AG, Kontron AG, Zürich; Chromatogramm siehe **Figur 5**) waren wie folgt:

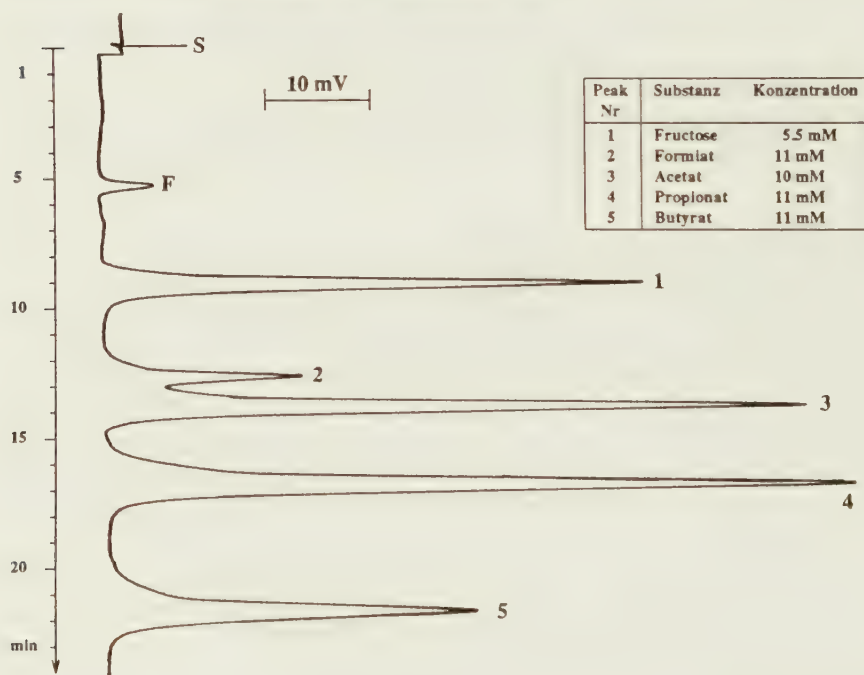
Detektor: FID
 Trägergas: Stickstoff, 50 ml/min
 Säulenmaterial: 60/80 Carbowax C 0.3% Carbowax 20M
 0.1% H₃PO₄ (Supelco SA, Gland)
 Betriebstemperatur: 120 °C isotherm oder programmiert 4 Min bei
 120 °C, dann 12 °C/min bis 200 °C
 Injektortemperatur: 200 °C.

Die Peakauswertung erfolgte mit einem Integrator (RPR - G1 GC Prozessor von Shimadzu). Die Proben wurden nach den Angaben von *H. Brandl* (1986) vorbehandelt.



Figur 5: Testchromatogramm von niederen Fettsäuren. Detektor FID, Carbowax C Säule, 50 ml/min N₂, 120 °C isotherm, Auftragsmenge 1 µl. (Präparation nach *Brandl* 1986). F: Frontpeak.

Fructose und Formiat sowie Acetat, Propionat und Butyrat wurde mittels HPLC bestimmt. Die Messung wurde mit einer Vorsäule und einer Hauptsäule (AMINEX HPX-85H 40 x ø4.6mm resp. AMINEX HPX-87H 300 x ø7.8mm, Biorad, Glattbrugg) durchgeführt. Die Pumpen waren entweder von WATERS (6000A, Brechbühler AG, Schlieren), ALTEX (110SN237355, Kontron AG, Zürich) oder KONTRON (Typ 420, Kontron AG, Zürich). Die Injektion erfolgte mit einem ALTEX (Typ 905-00) Injektor mit 100 µl Loop, die Messung mit einem Differentialrefraktometer (Typ 98.00, KNAUER SA, Belmont/Lausanne). Die Säulentemperatur betrug 35 °C, das Laufmittel war 0.01 N H₂SO₄. **Figur 6** zeigt ein Chromatogramm.

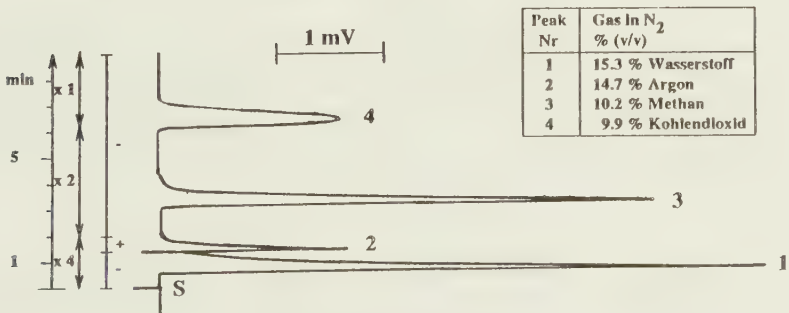


Figur 6: Test HPLC - Chromatogramm von *Fructose und Fettsäuren*. Brechungsindexdetektor (RI x16), Aminex HPX-87H Säule 35 °C, 0.8 ml/min 0.01 N H₂SO₄, 100 µl Loop.
S: Start, F: Frontpeak.

Für die Bestimmungen wurden nach der Probennahme im Fermenter 2 ml Kultur bei 1500g zentrifugiert (15 Minuten bei Stufe 10, ca. 3500 U/min, Zentrifuge UJ3, M. Christ, Osterade, BRD) und die Überstände bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Injektion im HPLC filtrierte ich die Überstände (Filter: Gelman ACRO LC 13 oder LC 3A, Skan AG, Basel) und pipettierte 1 µl 5 N HCl pro 0.5 ml Probe dazu.

Methan konnte gaschromatographisch (Shimadzu GC-R1A mit 180 µl Loop und FID Detektor; Shimadzu Corp., Kyoto, JPN) mit einer MS5A Säule (Supelco Inc., Bellefonte PA, USA) bei einer Temperatur von 200 °C und 50 ml/min N₂ als Trägergas gemessen werden. Der Integrator war identisch mit demjenigen der gaschromatographischen Fettsäurebestimmung.

Methan, Wasserstoff und Kohlendioxid wurden mit einem Gaschromatographen 69-550 GOW-Mac (GOW-Mac Instrument Co. Madison NJ, USA) mit TCD Detektor bei einer Detektortemperatur von 100 °C und einem Brückenstrom von 150 mA gemessen. Stickstoff (10 ml/min) diente als Trägergas für die auf 150 °C gehaltene Carbosieve S - Säule (Brechtbühler AG, Schlieren). Die Injektion der Gasproben erfolgte mit einem pneumatisch schaltbaren Probenventil (Carlo Erba, Milano, I), das aufgetragene Volumen betrug 2.8 ml. In **Figur 7** ist ein Chromatogramm dargestellt.



Figur 7: Testgaschromatogramm (GOW-Mac) von Gasen. Säule Carbosieve S, Detektor TCD. Erläuterungen im Text. S Start; x4, x2, x1 Abschwächungsfaktoren; +, - Polarität des Messsignals.

Die Menge der Biomasse wurde wie folgt charakterisiert:

- Die Messung der **Absorption** erfolgte bei 660 nm (A660, Uvikon 810, Kontron AG, Zürich), wobei die Proben wegen des partikulären amorphen Eisensulfides mit 0.2 N HCl angesäuert wurden (1:2 Verdünnung). Stieg die Absorption über einen Wert von 0.3, wurde mit destilliertem Wasser entsprechend verdünnt.
- Die Zellzahlbestimmung (**ZZ/ml**) erfolgte mit einer Neubauer - Zählkammer im Mikroskop (Wild M20, Brugg), wobei das Mittel aus 5 Zählungen berechnet wurde.
- Das Trockengewicht (**TG [g/l]**) wurde gravimetrisch bestimmt. Die Proben (8 - 15 ml) wurden mit 0.1 N HCl (in äquivalenter Menge) angesäuert um die Partikel zu lösen. Danach wurden sie durch vorgewogene Filter (Gelman Tuffryn HT-450, Skan AG, Basel, während 3h bei 105 °C getrocknet) filtriert und anschliessend über Nacht (mindestens 6 h) bei 105 °C getrocknet.

3.5. Berechnungen

Zur Berechnung der spezifischen Daten wurden die produzierten Gasmengen auf Standarddruck von 760 Torr und -temperatur von 0 °C umgerechnet. Als Bezugsgrössen für die Berechnung der spezifischen Daten dienten immer das aktuelle Trockengewicht **TG [g/l]** und das aktuelle Kulturvolumen **V [l]**, bestimmt bei der Probennahme.

Es galten folgende Berechnungsgrundlagen:

- Biomasseproduktion oder **Trockengewichtsertrag E [gTG/(l•h)]**:

$$E = TG_n \cdot D_n$$

TG_n : Trockengewicht zur Zeit n, D_n : Verdünnungsrate [h^{-1}].

- **Fructoseverbrauch V_{Fruc} [mMol/(l•h)]**:

$$V_{Fruc} = (Fruc_i - Fruc_n) \cdot D_n$$

$Fruc_i$: Fructosekonzentration im Zulauf,

$Fruc_n$: aktuelle Fructosekonzentration im Fermenter.

— **Acetatverbrauch V_{Ac} [mMol/(l·h)]:**

$$V_{Ac} = (Ac_i - Ac_n) \cdot D_n$$

Ac_i : Acetatkonzentration im Zulauf,

Ac_n : aktuelle Acetatkonzentration im Fermenter.

— **spezifischer Fructoseverbrauch Q_{Fruc} [mMol/(gTG·h)]:**

$$Q_{Fruc} = V_{Fruc,n} / TG_n$$

— **spezifischer Acetatverbrauch Q_{Ac} [mMol/(gTG·h)]:**

$$Q_{Ac} = V_{Ac,n} / TG_n$$

— **Acetatproduktion P_{Ac} [mMol/(l·h)]:**

$$P_{Ac} = Ac_n \cdot D_n$$

— **spezifische Acetatproduktion q_{Ac} [mMol/(gTG·h)]:**

$$q_{Ac} = P_{Ac,n} / TG_n$$

— **Methanproduktion P_{CH_4} [ml/(l·h)]:**

$$P_{CH_4} = F_{CH_4,n} / V_n$$

$F_{CH_4,n}$: Methanfluss zum Zeitpunkt n (Gasfluss·Methankonzentration),

V_n : aktuelles Kulturvolumen.

— **spezifische Methanproduktion q_{CH_4} [ml/(gTG·h)]:**

$$q_{CH_4} = P_{CH_4,n} / TG_n$$

— **Substratausbeute Y_{Fruc} , Y_{Ac} [gTG/Mol]:**

$$Y_{Fruc} = E / V_{Fruc}$$

$$Y_{Ac} = E / V_{Ac}$$

— **Produktausbeute y_{Ac} , Y_{CH_4} [gTG/Mol]:**

$$y_{Ac} = E / P_{Ac}$$

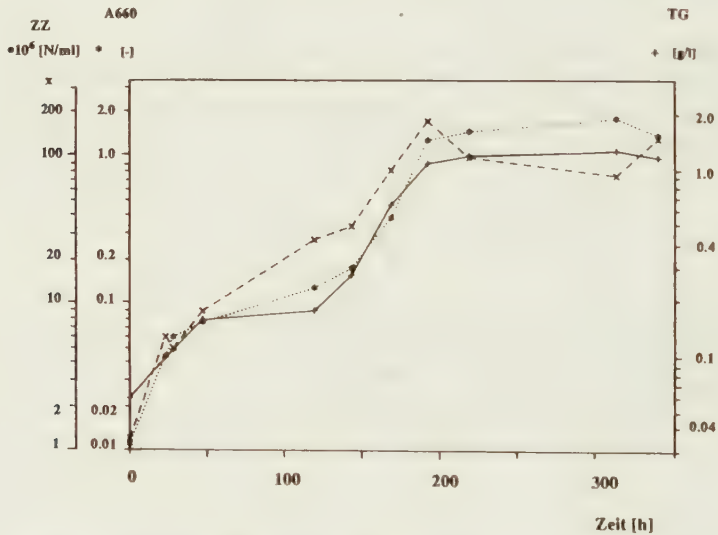
$$Y_{CH_4} = E / P_{CH_4}$$

4. RESULTATE

4.1. *Acetobacterium woodii* in Monokultur

a) Batchversuche

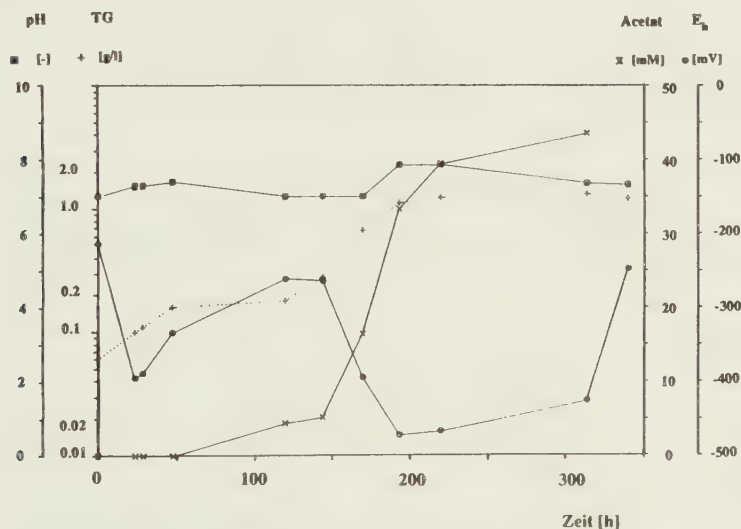
In den **Figuren 8 - 10** sind die Resultate von Wachstumsversuchen mit *A. woodii* WB1 dargestellt. Die erste **Figur 8** zeigt den zeitlichen Verlauf von Trockengewicht, Zellzahl und Absorption. Die Absorption und die Zellzahl sind mit einem Koeffizienten von $R = 0.979$ bzw. $R = 0.859$ zum Trockengewicht korreliert.



Figur 8: Absorption (A660), Zellzahl (ZZ) und Trockengewicht (TG) von *Acetobacterium woodii* im Verlauf einer Batchkultivation in logarithmischer Darstellung.

Während allen Batchversuchen liegen die Verdopplungszeiten zwischen 18 und 26 Stunden, was spezifischen Wachstumsraten zwischen $\mu = 0.039$ und 0.027 h^{-1} entspricht. Durch die Begasung mit Stickstoff werden der durch die Hydrogenase von *A. woodii* gebildete Wasserstoff, sowie auch Kohlendioxid, fast vollständig ausgetrieben. Das

Bakterium produziert somit weniger Acetat, als dies vom Abbauweg her postuliert wird (siehe auch **Figur 2**). **Figur 9** zeigt die zeitlichen Änderungen der Acetatkonzentration, des Trockengewichtes, des Redoxpotentials und des pH im gleichen Versuch bei 35 °C. Die Acetatkonzentration steigt entsprechend der Biomasse im Bereich zwischen 118 und 205 Stunden exponentiell an. Der pH liegt zwischen 7 und 8; wegen der Produktion von Säure wird der pH mit Natronlauge auf minimal 7.0 gehalten. Das Redoxpotential E_h sinkt während der gesteigerten Bildung von Essigsäure stark ab, was auf die Bildung von Wasserstoff zurückzuführen ist. Am Schluss des Versuches, nach 300 Stunden, steigt das Redoxpotential fast wieder auf den Ausgangswert an.

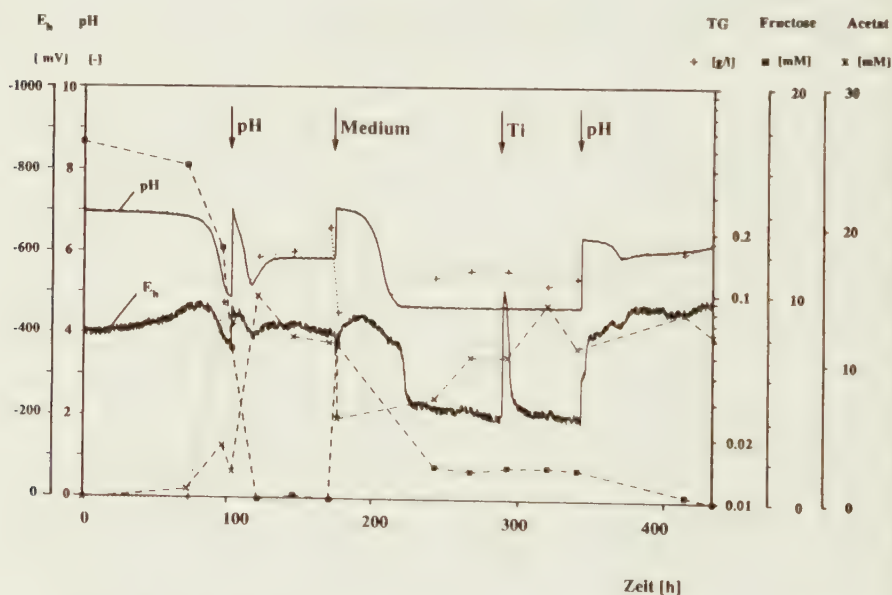


Figur 9: Verlauf der Kultivationsparameter pH und E_h , der Acetatkonzentration und des Trockengewichtes (TG) in einer Batchkultur mit *A. woodii*.

Figur 10 zeigt eine Folge von Versuchen, die an derselben Kultur durchgeführt wurde. Die ersten 172 Stunden zeigen ein ähnliches Bild wie in **Figur 9**. Der pH senkt sich nach 80 Stunden deutlich und wird nach 104 Stunden mit Natronlauge von pH 4.8 auf 7.0 zurückgestellt. Er sinkt während der exponentiellen Phase durch die Produktion von

Säure erneut rasch ab. Nach einer lag - Phase von 70 Stunden beginnt *A. woodii* exponentiell zu wachsen; die stationäre Phase beginnt, sobald das Substrat Fructose aufgebraucht ist. Der Verlauf des Redoxpotentials ist dem des pH sehr ähnlich.

Ein zweiter Versuch findet von Stunde 172 bis 336 statt. Die Kultur wird zu Beginn mit Medium 1:2 (v/v) verdünnt. Wieder ist ein deutliches Absinken des pH zu beobachten, verursacht durch die Bildung der Essigsäure, danach bleibt er konstant auf einem Wert von 4.8.



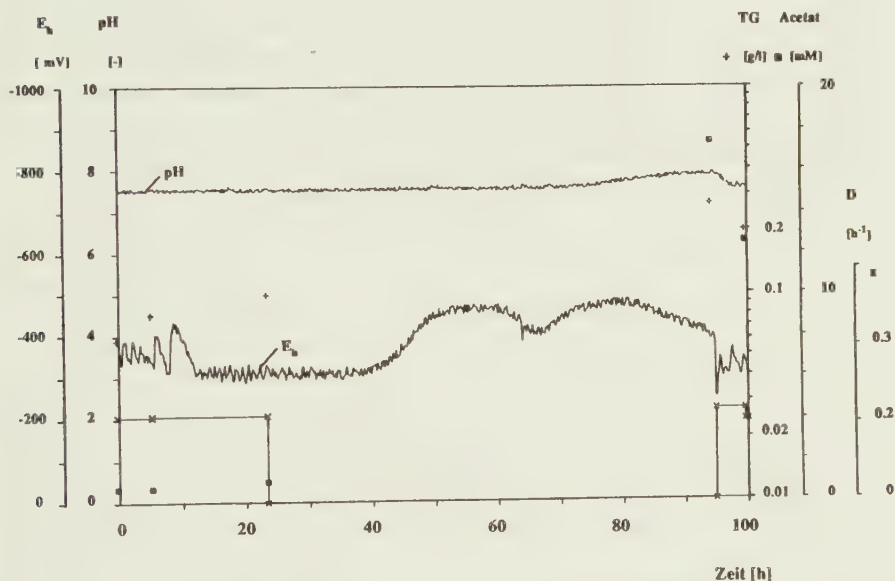
Figur 10: Batchkultivation von *Acetobacterium woodii*. Zeitlicher Verlauf des pH, E_h , der Fructose- und Acetatkonzentration, sowie des Trockengewichtes (TG).

↓ ... Zugaben von Medium, Lauge oder Reduktionsmittel (Ti), weitere Erläuterungen siehe Text.

Das Redoxpotential steigt im Gegensatz zu **Figur 9** an, was auf den pH - Abfall auf 4.8 zurückzuführen ist. Dies zeigt auch die Zugabe von Titan(III)citrat als Reduktionsmittel nach 290 Stunden; das Potenzial sinkt nur kurzfristig ab. Die Fructose wird nicht ganz

aufgebraucht, im Vergleich zum ersten Teil des Versuches werden wenig Essigsäure und Biomasse gebildet.

Die pH - Abhängigkeit des Redoxpotentials zeigt sich am deutlichsten im dritten Teil des Versuches nach 336 Stunden, wo der pH auf 6.0 geregelt wird. *A. woodii* verbraucht den Rest der Fructose und bildet Acetat. Wasserstoff und Kohlendioxid sind ebenfalls gaschromatographisch nachweisbar.

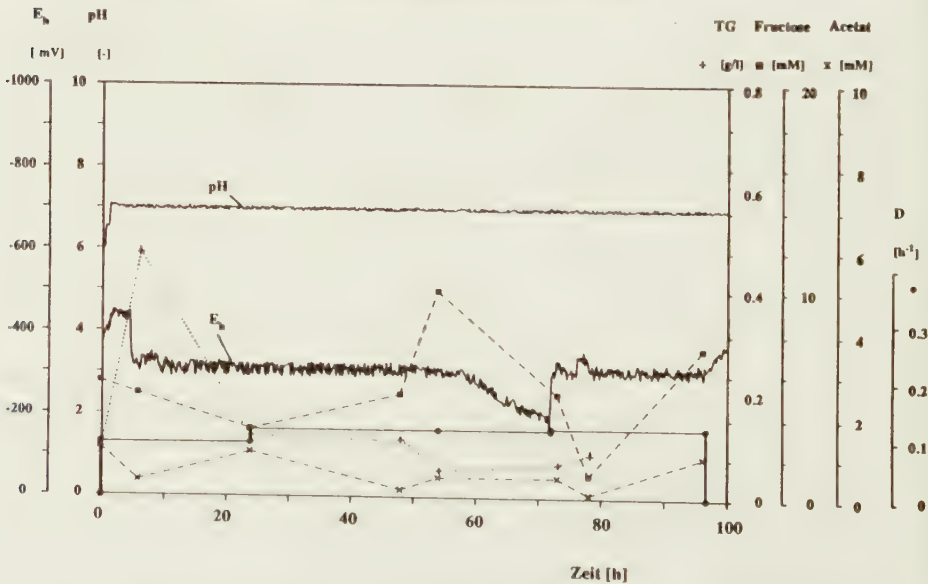


Figur 11: Zeitlicher Verlauf von pH, E_h , Trockengewicht (TG), Acetatkonzentration zwischen zwei kontinuierlichen Kultivationen. D: Verdünnungsrate.

Figur 11 gibt das Verhalten zwischen zwei Chemostatversuchen, d. h. einer Batchkultivation mit bereits zu Beginn exponentiell wachsenden Zellen, wieder. Bei konstantem pH von 7.5 zeigt sich der Abfall des Redoxpotentials um 100 mV nach 40 Stunden erneut, analog zu der Darstellung in Figur 9.

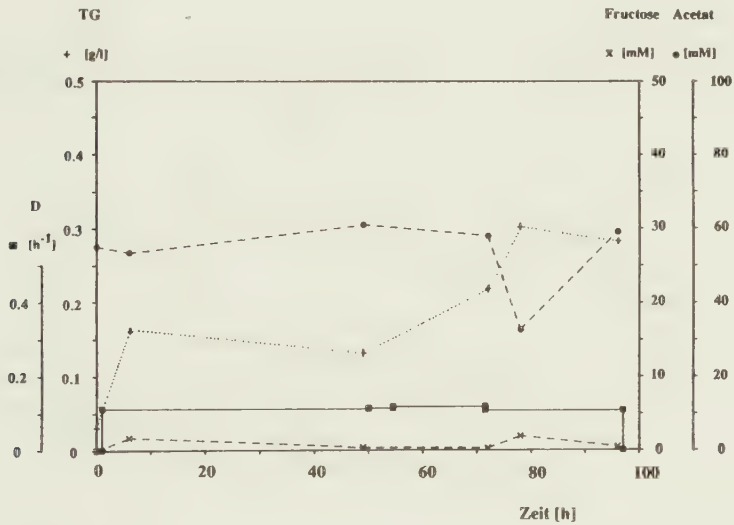
c) Chemostatkultivationen

Die Chemostatversuche dienten zur Ermittlung von optimalen pH- und Temperaturbedingungen im Hinblick auf die spätere Mischkultivation. Chemostatversuche sind in den Figuren 12 bis 17 dargestellt. **Figur 12** zeigt neben den Variablen Trockengewicht, Fructose- und Acetatkonzentration die Parameter pH und E_h . Der Anstieg des Redoxpotentials nach 60 Stunden ist auf eine Drift der Elektrode zurückzuführen. Die Drift tritt bei langen Kultivationszeiten öfters auf und ist bedingt durch die Verschmutzung des Diaphragmas mit Eisensulfid. Dieser Effekt konnte durch das später verwendete amorphe Eisensulfid weitgehend vermieden werden. Die Bedingungen bei diesem Versuch sind 30 °C, pH 7.0, E_h -300 mV und 16.7 mM Fructose im Zulauf. Das Redoxpotential bleibt, mit der oben erwähnten Ausnahme, auf ± 10 mV konstant und ist im zudosierten Medium entsprechend eingestellt.



Figur 12: Verlauf von pH, E_h , Trockengewicht (TG), Acetat- und Fructosekonzentration in kontinuierlicher Kultivation von *A. woodii*. D: Verdünnungsrate (Erläuterungen siehe Text).

Nahezu identische Verläufe von pH und E_h ergaben sich in den weiteren Versuchen. Die Biomasse, als Trockengewicht dargestellt, steigt in **Figur 12** vorerst an und erreicht nach einem Abfall stationäre Werte. Auch die Fructose- und Acetatkonzentrationen pendeln sich auf stationäre Werte ein, wenn man die Genauigkeit (10% Fehler) bei der Bestimmung berücksichtigt.



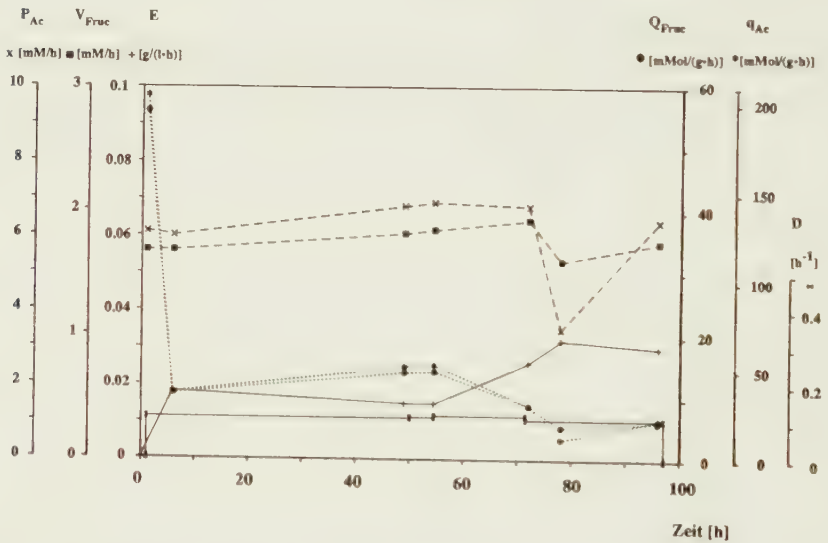
Figur 13: Zeitlicher Verlauf von Trockengewicht (TG), Acetat- und Fructosekonzentration in kontinuierlicher Kultivierung von *A. woodii*.

D: Verdünnungsrate. Bedingungen pH 7.0, 40 °C.

In **Figur 13** sind das Trockengewicht, die Verdünnungsrate, die Acetat- und Fructosekonzentration eines Versuches bei pH 7.0, E_h -300 mV und 40 °C aufgezeichnet. Das Trockengewicht bleibt nach einem ersten Anstieg zu Beginn der Kultivierung, im Gegensatz zum Verlauf in **Figur 12**, während 40 Stunden nahezu konstant. Anschliessend steigt das Trockengewicht erneut und bleibt bis zum Ende des Versuches

gleich. Die niedrige Acetatkonzentration bei 78 Stunden ist möglicherweise auf eine Fehlmessung zurückzuführen.

In **Figur 14** sind die zu **Figur 13** zugehörigen spezifischen Daten dargestellt. Die volumenspezifischen wie auch die biomassespezifischen Parameter zeigen nahezu ähnliche Verläufe.

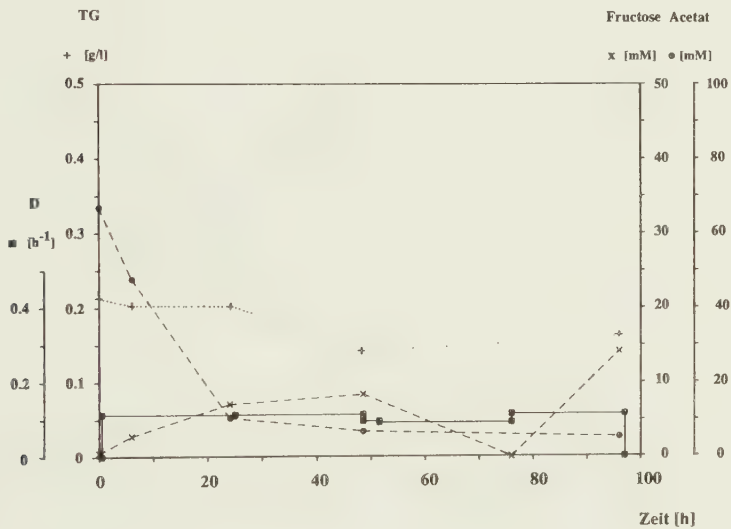


Figur 14: Verlauf des Trockengewichtsertrages (E), des Fructoseverbrauches (V_{Fruc}), der Acetatproduktion (P_{Ac}), sowie des spezifischen Fructoseverbrauchs (Q_{Fruc}) und der spezifischen Acetatproduktion (q_{Ac}) in kontinuierlicher Kultur. D : Verdünnungsrate. Bedingungen siehe **Figur 13**.

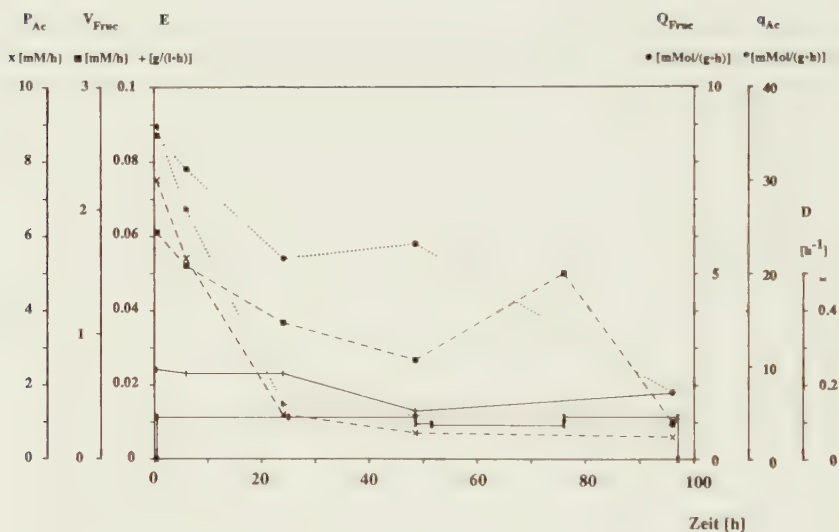
Ein weiterer Versuch ist in den **Figuren 15** und **16** dargestellt. Die Bedingungen sind mit Ausnahme des pH identisch mit den Bedingungen im Versuch dargestellt in den **Figuren 13** und **14**. Der pH beträgt 7.5. Während bei pH 7.0 die Fructosekonzentration in Fermenter fast Null beträgt, ist bei pH 7.5 noch eine Konzentration zwischen 8 - 10 mM

messbar. Entsprechend ist auch die Acetatkonzentration geringer.

Die spezifischen Werte des Fructoseverbrauches und der Acetatproduktion, dargestellt in **Figur 16**, sind bei pH 7.5 geringer als bei pH 7.0. Auch der Trockengewichtsertrag bei pH 7.5 fällt ca. 1/3 kleiner aus als in der Kultivation bei pH 7.0.



Figur 15: Verlauf des Trockengewichtes (TG), der Fructose- und Acetatkonzentration in kontinuierlicher Kultur von *A. woodii*. D: Verdünnungsrate. Bedingungen pH 7.5, 40 °C.

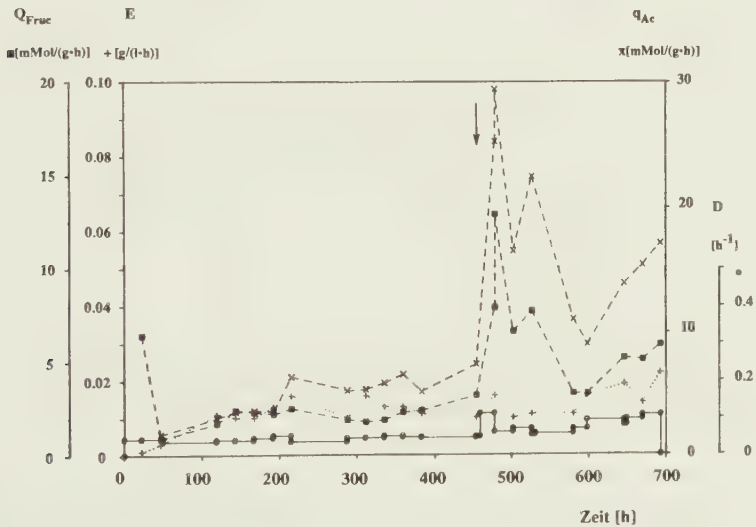


Figur 16: Verlauf des Trockengewichtsertrages (E), des Fructoseverbrauches (V_{Fruc}), der Acetatproduktion (P_{Ac}), sowie des spezifischen Fructoseverbrauchs (Q_{Fruc}) und der spezifischen Acetatproduktion (q_{Ac}) in kontinuierlicher Kultur. D : Verdünnungsrate. Bedingungen siehe **Figur 15**.

Die spezifischen, stationären Werte für Trockengewichtsertrag, Fructoseverbrauch und Acetatproduktion der kontinuierlichen Kultivationen unter verschiedenen Temperatur- und pH - Bedingungen sind im Kapitel **Diskussion** in der **Tabelle 5** zusammengefasst.

Im Hinblick auf die Mischkultivation wurden auch Langzeitversuche durchgeführt. Ein solcher ist in **Figur 17** dargestellt. Die Kultivation erfolgte bei einer Temperatur von 35 °C und einem pH von 7.0. Das Redoxpotential blieb während der Kultivation in einem kleinen Bereich von ± 25 mV konstant, auch wenn keine Regelung erfolgte.

Die spezifischen Werte für Trockengewichtsertrag, Fructoseverbrauch und Acetatproduktion in **Figur 17** sind über eine Zeit von 300 Stunden nahezu konstant. Nach 455 Stunden wird die Verdünnungsrate erhöht und die Fructosezulaukonzentration von 16.7 mM auf 31.6 mM gesteigert. *A. woodii* zeigt eine schnelle Anpassung an die erhöhten Vorgaben, sichtbar am Verlauf der spezifischen Werte. Fructose konnte im Fermenter nicht mehr nachgewiesen werden.



Figur 17: Langzeitchemostat mit *A. woodii* über 700 Stunden. Verlauf der spezifischen Parameter Trockengewichtsertrag (E), Fructoseverbrauch (Q_{Fruc}) und Acetatproduktion (q_{Ac}). D: Verdünnungsrate, ↓ Erhöhung der Verdünnungsrate. Bedingungen 35 °C und pH 7.0.

4.2. Die methanogenen Bakterien in Monokultur.

a) Flaschenkultivation

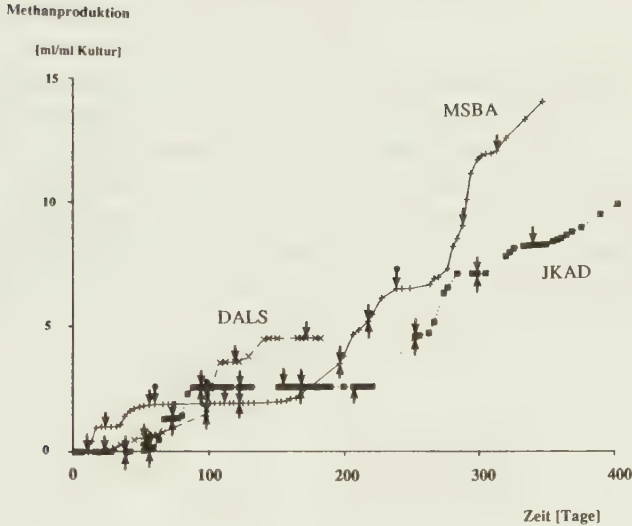
Vor der ersten Kultivation im Fermenter wurden Versuche mit verschiedenen Medien in Flaschen durchgeführt. Dabei wurden die Medien nach Winter & Wolfe (1980), Scherer & Sahm (1981) und Hippe et al. (1979, ohne Hefeextrakt) zubereitet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Medium	Σ ml CH ₄ /ml Kultur	
	nach 14 Tagen	nach 80 Tagen
Hippe	< 0.01	108
Winter	0.2	0.4
DM	0.2	0.4
Scherer	108	110

Tabelle 4: Methanproduktion von *Methanosarcina* sp. JKAD in Flaschenkulturen mit verschiedenen Medien.

Nach 14 Tagen ist die Methanproduktion von *Methanosarcina* sp. JKAD mit dem Medium nach Scherer & Sahm (1981) erheblich grösser als mit den anderen Medien. Deshalb wurde das Medium nach Scherer & Sahm für die weiteren Versuche gewählt und als SM - Medium bezeichnet.

In **Figur 18** sind die Flaschenversuche mit *Methanosarcina barkeri* 227 (MSBA), *Methanosarcina* sp. JKAD und *Methanosarcina* sp. DALS über Zeiträume bis zu 400 Tagen dargestellt. Bei *M. barkeri* 227 und *Methanosarcina* sp. JKAD ist nach anfänglicher Methanproduktion ein Stillstand während 40 respektive 80 Tagen zu verzeichnen; auch nach Zugaben von Acetat oder frischem Medium (markiert durch Pfeile) kann erst nach 120 - 150 Tagen eine erneute Produktion von Methan beobachtet werden.



Figur 18: Flaschenkultivierung von *Methanosarcina barkeri* 227 (MSBA), *Methanosarcina* sp. JKAD und *Methanosarcina* sp. DALS. Verlauf der Methanproduktion. ↓ Zugabe von Acetat, ↓ Zugabe von Medium, ↑ Neutralisation auf pH 7.0 - 7.5.

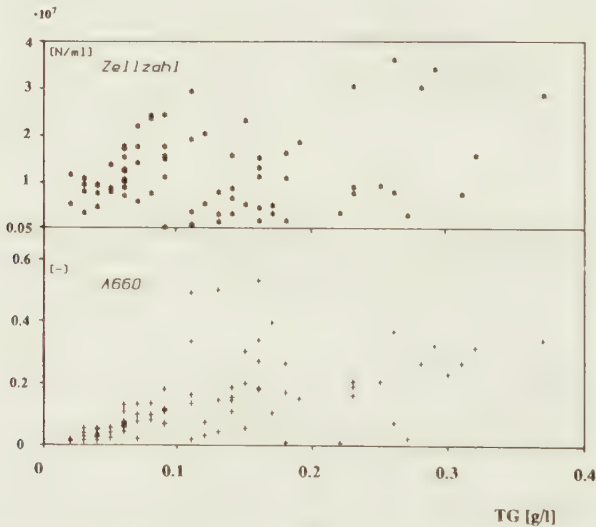
Der Stillstand in der Methanbildung ist möglicherweise auf eine Ansäuerung des Mediums bis auf pH 5.0 - 5.5 zurückzuführen, nach der Neutralisation (markiert durch Pfeile) beginnen die Bakterien nach 25 - 30 Tagen wieder Methan zu bilden.

Bei der Kultivierung von *Methanosarcina* sp. DALS ist dieser Stillstand in der Methanproduktion nicht erkennbar. Diese Versuche zeigen die Schwierigkeiten der Flaschenkultivierung deutlich auf. Vor allem der pH kann nur ungenügend kontrolliert werden. Weniger grosse pH Veränderungen ergibt die Anwendung von Acetat als Säure oder als Kalziumsalz.

Die maximale volumenspezifische Methanproduktion beträgt für *Methanosarcina barkeri* 227 0.35 ml CH₄/(ml Kultur•Tag), für *Methanosarcina* sp. JKAD 0.28 ml CH₄/(ml•Tag) und für *Methansarcina* sp. DALS 0.33 ml CH₄/(ml•Tag).

c) Fermenterkultivation

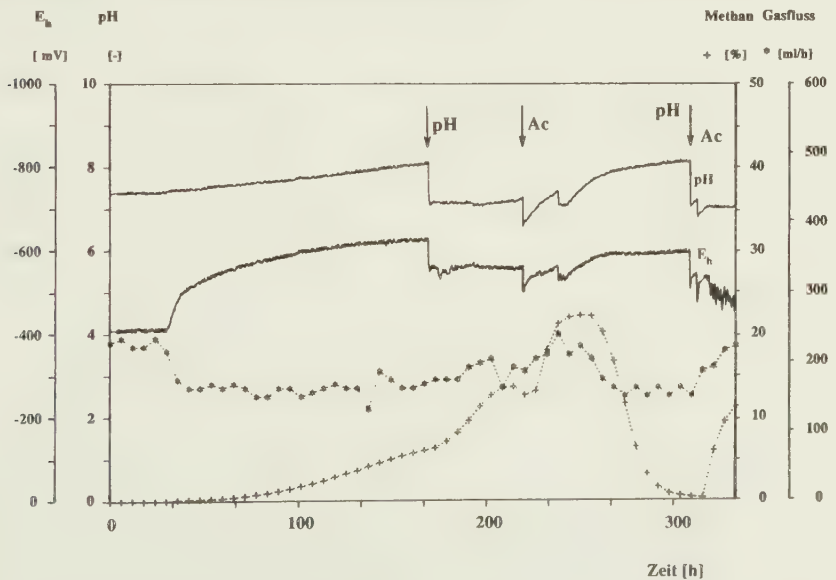
Es war trotz ausgedehnten Versuchen nicht möglich, *Methanosarcina barkeri* 227 im Fermenter zu züchten. Obwohl bei allen Versuchen 1 - 2 Monate für die Anpassung an die veränderten Bedingungen (konstante Begasung, konstanter pH und durchmischte Kultur) gegenüber der Flaschenkultivation gewartet wurde (nach Wolfe 1979), stellte sich keine nennenswerte Methanproduktion ein. Diese Umstellungsphase dauerte bei den anderen beiden methanogenen Stämme JKAD und DAL5 ebenfalls mehrere Wochen. Die weiteren Kultivationsversuche im Fermenter wurden nur mit *Methanosarcina* sp. JKAD und DAL5 durchgeführt.



Figur 19: Korrelation von Zellzahl (oberer Teil) und Absorption (A660, unterer Teil) zum Trockengewicht (TG) mit *Methanosarcina* sp. JKAD im Fermenter.

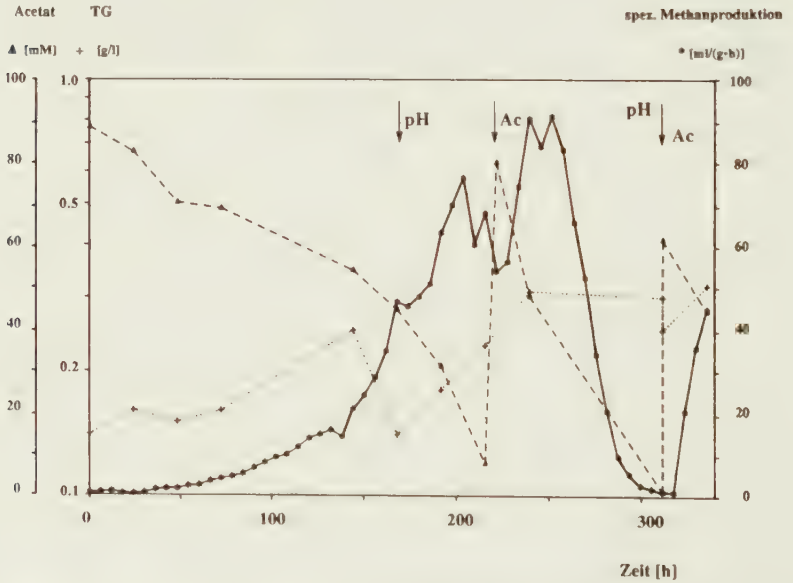
Die Figur 19 zeigt die Korrelation der Zellzahl und der Absorption zum Trockengewicht. Weder die Zellzahl noch die Absorption bei 660 nm zeigen sich zum Trockengewicht korrelierbar (Korrelationskoeffizienten $R = 0.26$ respektive $R = 0.54$; die Korrelation ist

mit dem 95% t - Test nicht signifikant). Die fehlende Korrelation ist begründet durch die Morphologie der Bakterien. Beide Stämme, *Methanosarcina* sp. DALS und JKAD, zeigen einen ähnlichen Polymorphismus wie *Methanosarcina mazei* (Mah 1980, Zhilina 1976), wo im Mikroskop neben einzelnen Kokken auch Sarcinapakete und hüllenartige Strukturen beobachtet werden können. Meist kommen alle Stadien gleichzeitig in variabler Verteilung vor und die Grössen variieren von 2 μm (Einzelzellen) bis 1 mm (Pakete von Zellen). Die Auszählung im Mikroskop ist wegen der Grösse der Sarcinapakete schwierig. Die Bakterien teilen sich nicht in regelmässigen Ebenen, so dass die einzelnen Individuen nur mit dem Elektronenmikroskop festzustellen sind. Die Abschätzung der Anzahl Bakterien in solchen Paketen ist deshalb nur ansatzweise möglich. Die mikroskopischen Bestimmungen sind jedoch wichtig, um eventuelle Veränderungen der Zellen oder Kontaminationen zu erkennen.



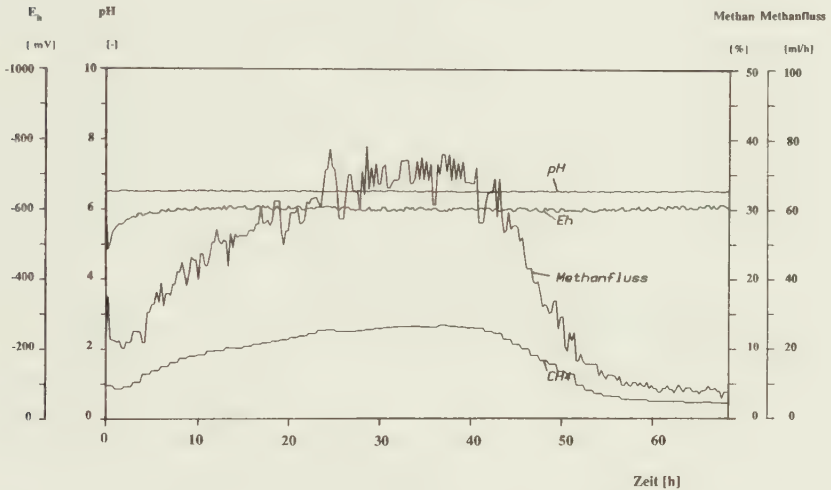
Figur 20: Verlauf von pH, E_h , Methankonzentration und Gasfluss im Batch von *Methanosarcina* sp. JKAD. $\downarrow$ pH Neutralisation mit Säure, $\downarrow$ Ac Zugabe von Acetat, weitere Erläuterungen siehe Text.

In den **Figuren 20 - 23** sind Batchkultivationen von *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS dargestellt. Die Biomasse, charakterisiert durch das Trockengewicht, zeigt in den Bereichen von 47 bis 146 Stunden, von 167 bis 239 Stunden und von 311 bis 334 Stunden exponentielle Verläufe mit spezifischen Wachstumsraten von $\mu = 0.007 \text{ h}^{-1}$ bzw. 0.011 h^{-1} . Acetat wird zum limitierenden Faktor, was sich in den **Figuren 20 und 21** zeigt. Nach 211 und 308 Stunden wird Acetat zudosiert und beide Male steigert das Bakterium die Methanproduktion deutlich.



Figur 21: Verlauf der Acetatkonzentration, des Trockengewichtes (TG) und der spezifischen Methanproduktion während der Batchkultivation mit *Methanosarcina* sp. JKAD aus **Figur 20**. ↓pH Neutralisation mit Säure, ↓Ac Zugabe von Acetat, weitere Erläuterungen siehe Text.

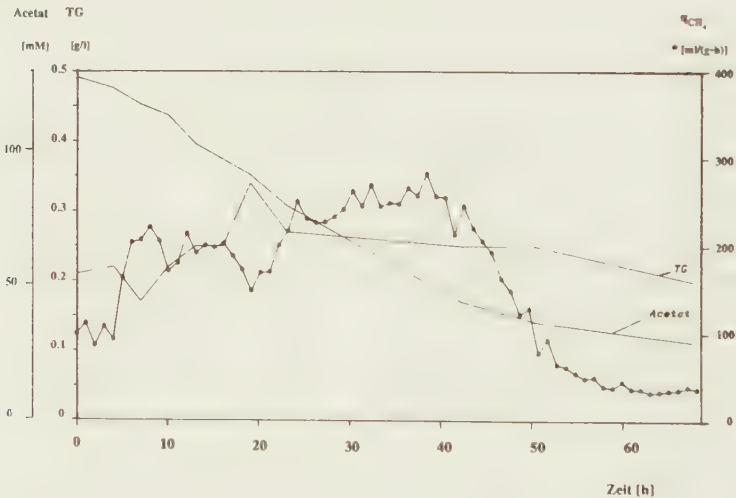
Die maximale spezifische Methanproduktion in Batchkultivation erreicht bei *Methanosarcina* sp. JKAD einen Wert von 90 - 100 ml $\text{CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ [4 - 4.5 mMol/(gTG·h)].



Figur 22: Verlauf von pH, E_h , Methankonzentration und Methanfluss im Verlaufe einer Batchkultivation von *Methanosarcina* sp. DALS.

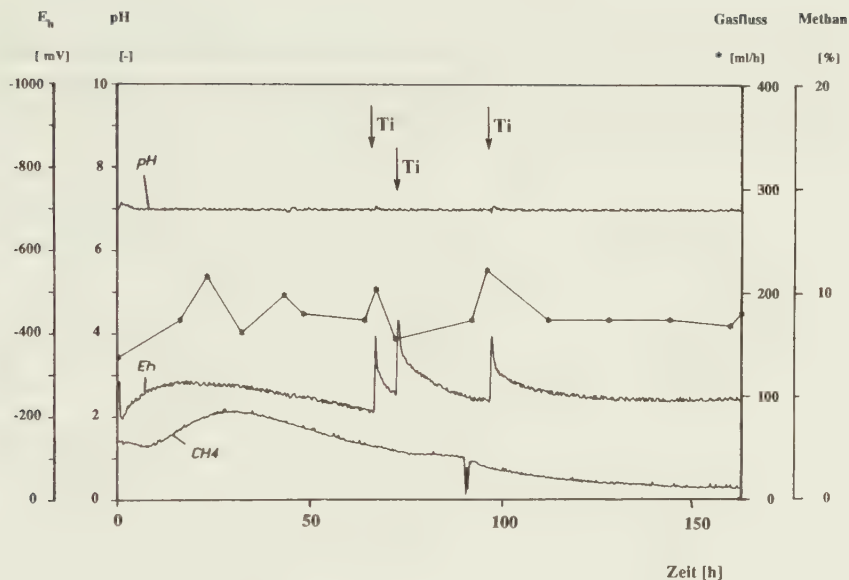
Ein Batchversuch mit *Methanosarcina* Stamm DALS ist in den Figuren 22 und 23 dargestellt. Die Methankonzentration im austretenden Gas und der Methanfluss (Figur 22) erhöhen sich in kleinerem Masse als in der Kultivation von *Methanosarcina* Stamm JKAD (Figur 20). Der pH bleibt während der ganzen Versuchszeit konstant bei 6.5, das Redoxpotential ist mit Ausnahme zu Beginn des Versuches konstant bei -600 mV.

Die spezifische Methanproduktion (**Figur 23**) steigt nach einer kurzen lag - Phase von 6 Stunden an und erreicht einen Wert von 250 - 270 ml $\text{CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ [11.2 - 12.1 mMol/(g·h)]. Die Acetatkonzentration nimmt linear ab, wobei die Abnahme nach 42 Stunden weniger steil verläuft. Das Trockengewicht nimmt in den ersten 20 Stunden zu und wird gegen Ende des Versuches wieder kleiner.



Figur 23: Verlauf der Acetatkonzentration, des Trockengewichtes (TG) und der Methanleistung (q_{CH_4}) in der Batchkultivation von *Methanosarcina* sp. DAL5 aus **Figur 22**.

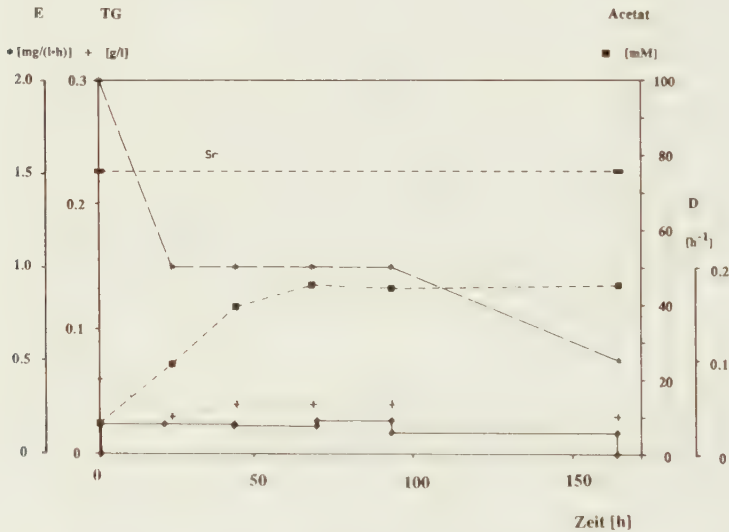
In Chemostatkultur wählte ich aufgrund der geringen Wachstumsraten in Batchkultivation entsprechend niedrige Verdünnungsraten zwischen $D = 0.006$ und 0.036 h^{-1} , was Verdopplungszeiten von 19 - 120 Stunden entspricht. Der typische Verlauf der Variablen während einer Chemostatkultur ist am Beispiel der **Figuren 24 bis 26** ersichtlich. Der Versuch wurde mit *Methanosarcina* sp. JKAD durchgeführt.



Figur 24: Chemostatkultivation von *Methanosarcina* sp. JKAD. Verlauf von pH, E_h , Gasfluss und Methankonzentration. $\downarrow$ Ti Zugabe von Titancitrat als Reduktionsmittel.

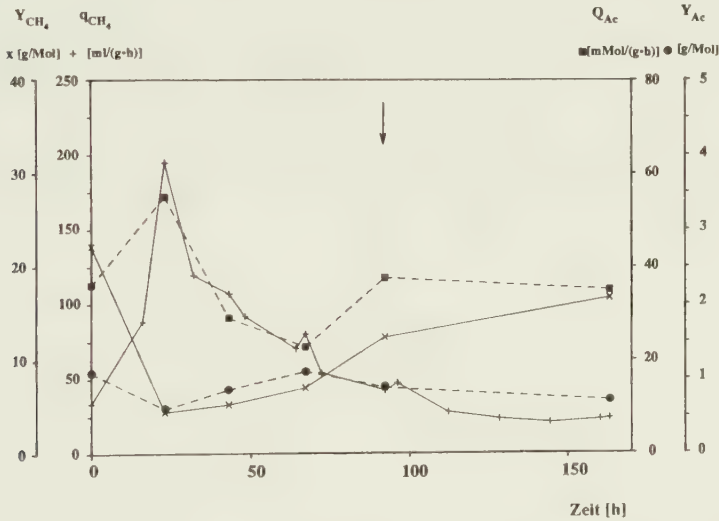
Die Zugaben von Reduktionsmittel (Ti(III)citrat) nach 64, 73 und 98 Stunden im Versuch, dargestellt in **Figur 24**, zeigen nur kurzfristige veränderte Redoxbedingungen und bestätigen die starke Redox - Pufferkapazität, die im Medium vorgegeben wird; schon nach wenigen Stunden strebt das Potential wieder dem Ausgangswert vor der Zugabe zu. Der Methangehalt im austretenden Gas erreicht nach 30 Stunden ein Maximum von 4.2 % CH_4 .

In **Figur 25** sind der Verlauf des Trockengewichtes, der Acetatkonzentration, der Verdünnungsrate und des Trockengewichtsertrages aus dem gleichen Versuch wie **Figur 24** dargestellt. Die Acetatkonzentration und das Trockengewicht sind nach 60 Stunden konstant und ändern sich nicht, auch wenn die Verdünnungsrate von 0.031 h^{-1} auf 0.024 h^{-1} erniedrigt wird. Die Herabsetzung der Verdünnungsrate nach 90 Stunden wirkt sich nur im Trockengewichtsertrag aus; er sinkt auf die Hälfte.



Figur 25: Trockengewichtsertrag E, Acetatkonzentration und Trockengewicht (TG) aus dem Versuch dargestellt in **Figur 24**. D: Verdünnungsrate, Sr: Acetatzulaufkonzentration.

Die spezifischen Variablen Methanproduktion, Methanausbeute, Acetatverbrauch und Acetatausbeute aus dem gleichen Versuch (Figuren 24 und 25) sind in Figur 25 aufgezeichnet. Nach einer ersten Anpassungsphase von 50 Stunden erreichen die Variablen stationäre Werte. Wird die Verdünnungsrate nach 93 Stunden herabgesetzt, dauert es nur 25 Stunden bis die spezifische Methanproduktion konstante Werte annimmt.



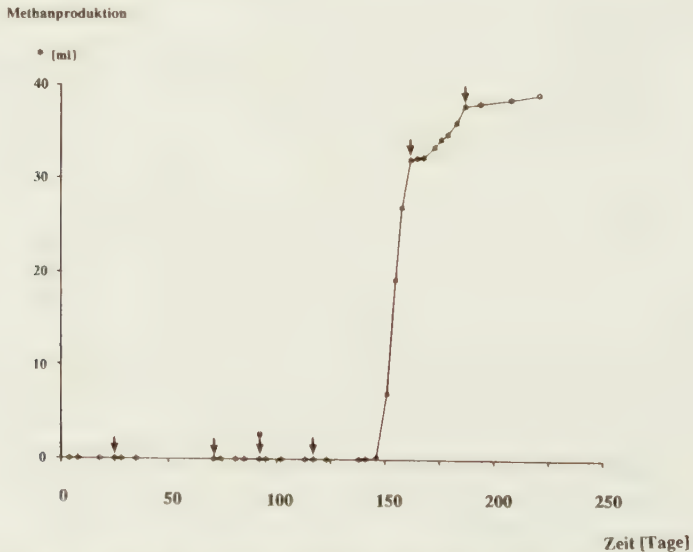
Figur 26: Spezifische Methanproduktion (q_{CH_4}), Methanausbeute (Y_{CH_4}), spezifischer Acetatverbrauch (Q_{Ac}) und Acetatausbeute (Y_{Ac}) aus dem Versuch dargestellt in Figur 24 und 25. ↓ Herabsetzung der Verdünnungsrate.

Die spezifischen Methanproduktionsraten erreichen im Vergleich zur maximalen Produktionsrate in der Batchkultivation tiefere Werte von 23 und 75 ml CH_4 /(gTG·h), [1.03 resp. 3.3 mMol/(gTG·h)].

4.3. Mischkulturen

a) Flaschenkultivationen

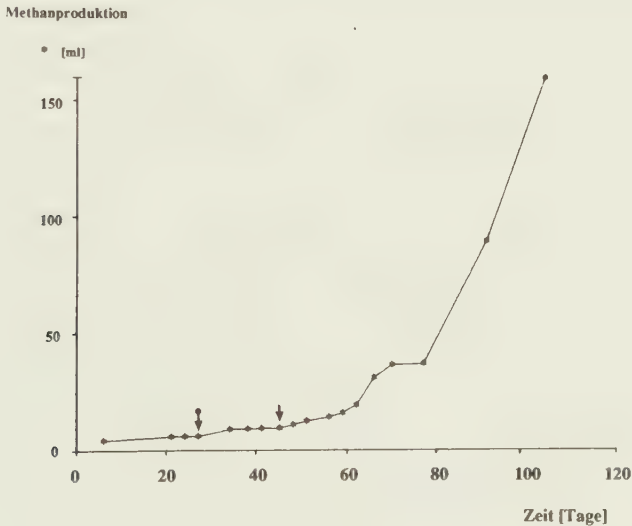
Erfolgreich konnte nur *Methanosarcina barkeri* 227 in Gemeinschaft mit *Acetobacterium woodii* in Flaschen gezüchtet werden. In Figur 27 ist die Bildung des Methans im Verlaufe der Kultivation dargestellt. Der Abbau des gebildeten Acetats wurde vor allem durch das Absinken des pH (siehe auch Figur 10) gehemmt, sicher aber auch durch die Produktion von Wasserstoff. Erst nach 145 Tagen setzt eine nennenswerte Methanproduktion ein. Die maximale Produktionsrate an Methan beträgt mit $0.055 \text{ ml CH}_4/(\text{ml Kultur} \cdot \text{Tag})$ 1/7 der maximalen Rate des Methanogenen in Monokultivation, ebenfalls in Flaschenkulturen.



Figur 27: Bildung von Methan aus Fructose in Flaschenkultur von *Acetobacterium woodii* mit *Methanosarcina barkeri* 227. ↓ pH - Neutralisierung mit Lauge und gleichzeitiger Substratzugabe, ↓ pH - Neutralisierung mit Lauge auf pH 7 - 7.5.

Im Vergleich zu diesem Experiment ist die Methanproduktion einer mit Fructose als Substrat angereicherten Kultur in **Figur 28** dargestellt. Die Kultur stammt aus einer Sedimentprobe des Sempachersees (siehe **Material und Methoden**). Die Vergärung der Fructose zu Acetat, H_2 und CO_2 durch Fermentierer erfolgt analog zum Habitattyp A. In Seesedimenten sind neben den acetatverwertenden auch obligat H_2/CO_2 verwertende Methanbakterien beteiligt. H_2/CO_2 als Substrat ermöglicht schnelleres Wachstum, sodass bereits nach wenigen Tagen eine Methanproduktion festzustellen ist.

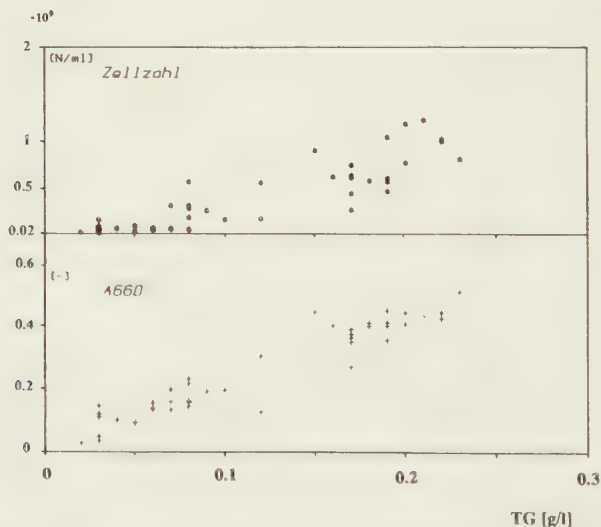
Die maximale Produktionsrate beträgt hier $0.14 \text{ ml } CH_4/(\text{ml Kultur} \cdot \text{Tag})$, was etwa einem Drittel der Produktionsrate im Vergleich zur Monokultur der Methanogenen entspricht.



Figur 28: Bildung von Methan in Flaschenkultur mit einer aus Sediment aus dem Sempachersee angereicherten Kultur mit Fructose als Substrat. ↓ Substratzufuhr und Neutralisierung mit NaOH, ↓ Substratzugabe.

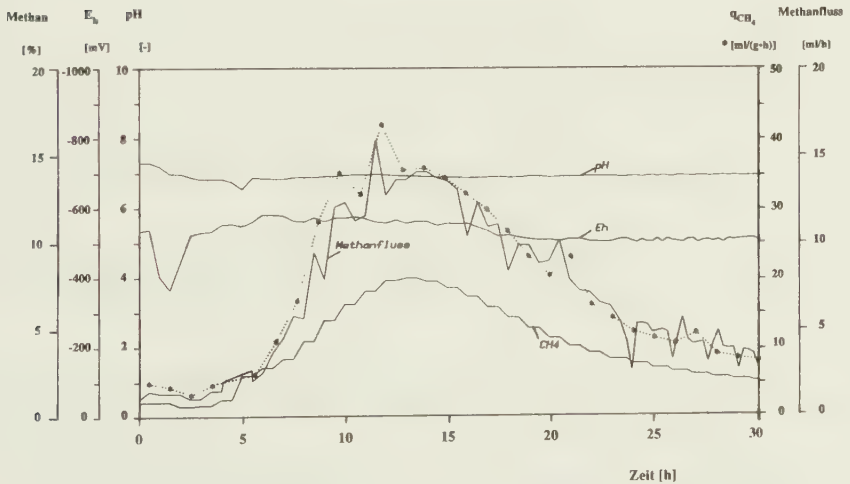
b) Fermenterkultivation

Wie schon mit der methanogenen Monokultur ergaben sich bei der Korrelation von Trockengewicht (TG) zur Zellzahl oder Absorption bei 660 nm auch in Mischkultivation dieselben Schwierigkeiten (Figur 29). Die Korrelationen betragen $R = 0.88$ für TG $\leftrightarrow$ Zellzahl und $R = 0.95$ für TG $\leftrightarrow$ Absorption bei 660 nm (A660). Die Signifikanz wird erreicht, weil *Acetobacterium woodii* in der Mischkultur vorherrscht. Die Zellzahl von *A. woodii* war generell um einen Faktor 10 - 20 grösser als diejenige der methanogenen Bakterien. Die Einschränkungen in der mikroskopischen Bestimmung, die für die Monokultur der methanogenen Bakterien gelten, treffen auch für die Mischkultur zu. Die Bestimmung diente deshalb nur der Beobachtung möglicher Kontaminanten. Solche wurden in keinen Versuchen festgestellt.



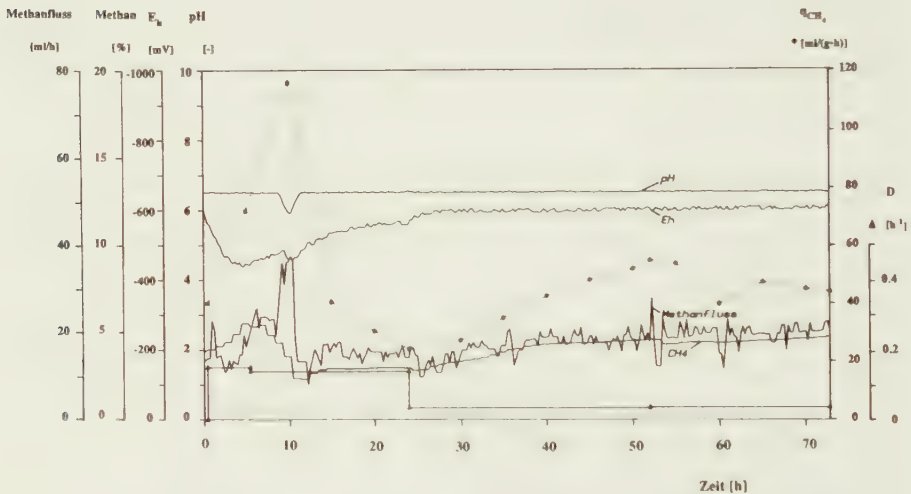
Figur 29: Korrelation von Zellzahl (obere Hälfte) und Absorption (A660, untere Hälfte) zum Trockengewicht (TG) in einer Mischkultur im Fermenter von *A. woodii* und *Methanosarcina* sp. JKAD.

In **Figur 30** ist der Verlauf der Methanbildung in Batchkultivation dargestellt. Die spezifische Methanproduktion steigt, verglichen mit den Versuchen in Monokultur, nach kurzer Zeit rasch an und erreicht nach 12 Stunden ein Maximum. Anschließend sinkt die spezifische Methanproduktion gegen Null, weil das durch *A. woodii* gebildete Acetat vollständig verbraucht wird. Die Schwankungen des Methanflusses und dementsprechend auch der spezifischen Methanproduktion sind messtechnisch bedingt. Der Gaszähler integriert in einer Treppenfunktion das Volumen des austretenden Gases. Bei den gewählten kleinen Durchflussraten wird das Volumen nicht monoton, sondern stufenförmig aufgezeichnet.



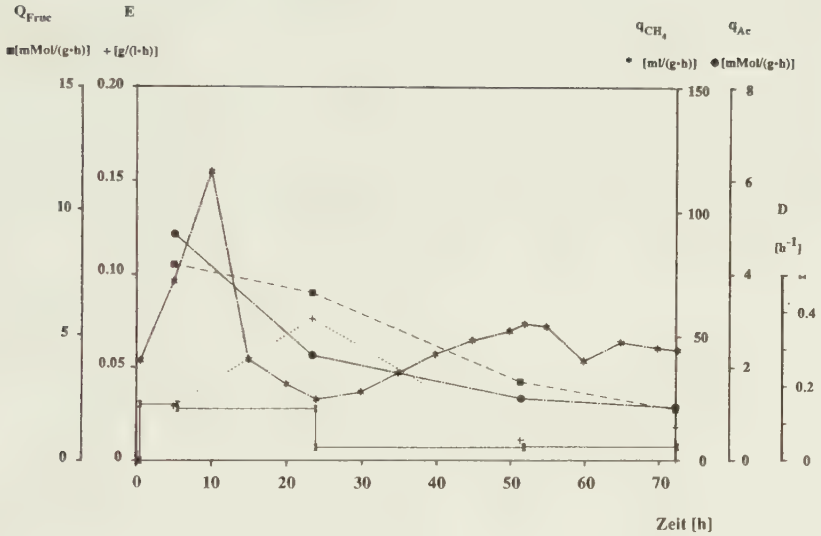
Figur 30: Verlauf von pH, E_h , Methankonzentration, Methanfluss und spezifischer Methanproduktion (q_{CH_4}) in Batchkultur von *A. woodii* und *Methanosarcina* sp. DALS.

In Chemostatkultivation, dargestellt in **Figur 31** bis **34**, kann keine Fructose mehr im Fermenter gemessen werden. Die spezifische Methanproduktion in **Figur 31** stabilisiert sich auf einen Endwert von $45 \text{ ml CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$. Die Verdünnungsrate wird nach 24 Stunden von 0.139 h^{-1} auf 0.036 h^{-1} herabgesetzt, da die spezifische Methanproduktion nach 10 Stunden stark abfiel. Wie sich später zeigte, werden die methanogenen Bakterien bei der höheren Verdünnungsrate selektiv ausverdünnt.



Figur 31: Verlauf von E_h , pH, Methankonzentration, Methanfluss und spezifische Methanproduktion (q_{CH_4}) in Chemostatkultivation von *A. woodii* mit *Methanosarcina* sp. DAL5. D: Verdünnungsrate.

Zu diesem Versuch sind in **Figur 32** der spezifische Fructoseverbrauch, der Trockengewichtsertrag und die spezifischen Produktionen von Acetat und Methan dargestellt. Wie in methanogener Monokultur (**Figur 25** und **26**) sinkt der Trockengewichtsertrag nach dem Herabsetzen der Verdünnungsrate, während die spezifische Methanproduktionsrate ansteigt. Der spezifische Fructoseverbrauch sinkt ebenfalls, wie auch die spezifische Acetatproduktion.

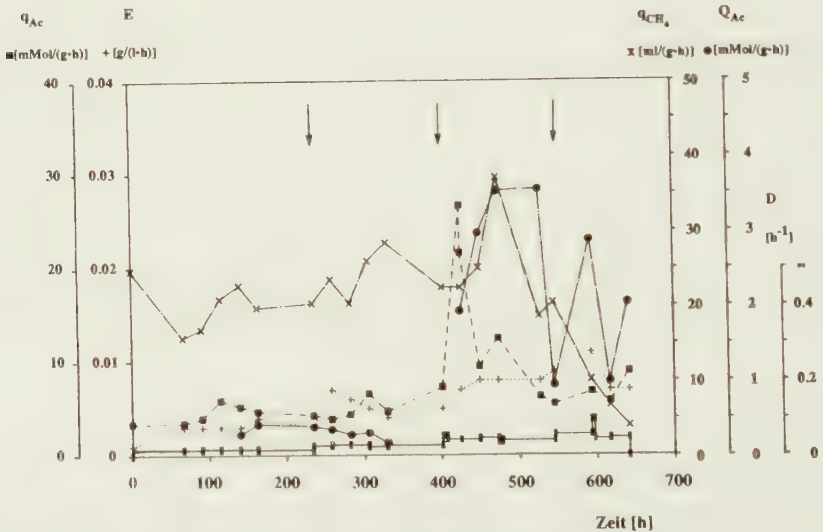


Figur 32: Verlauf des spezifischen Fructoseverbrauches Q_{Fruc} , des Trockengewichtsertrages E , der spezifischen Methanproduktion q_{CH_4} und der spezifischen Acetatproduktion (q_{Ac}) zum Versuch in Figur 31. D : Verdünnungsrate.

Aus den spezifischen Produktions- und Verbrauchsdaten der **Figur 32** lassen sich folgende Ausbeuten berechnen:

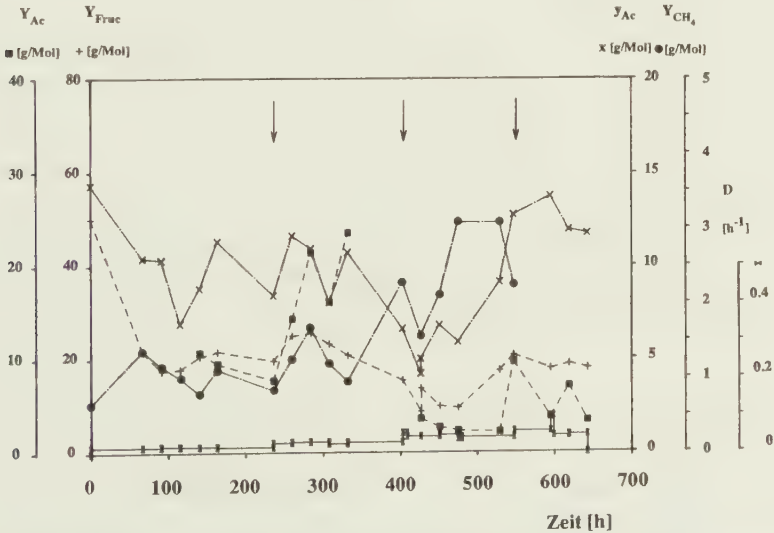
Die Ausbeute an Biomasse der Mischkultur pro Mol verbrauchter Fructose (Y_{Fruc}) ist bei beiden Verdünnungsraten nahezu gleich und erreicht Werte von 20.8 respektive 18.2 gTG/Mol. Der stationäre Wert der Ausbeute an Biomasse pro Mol produziertem Methan (Y_{CH_4}) beträgt 40.1 gTG/Mol bei der kleineren Verdünnungsrate von 0.036 h⁻¹. Die Ausbeute an Biomasse pro Mol produziertem Acetat beträgt 62.3 gTG/Mol bei $D = 0.139 \text{ h}^{-1}$ und 36.0 gTG/Mol bei $D = 0.036 \text{ h}^{-1}$.

In den Figuren 33 und 34 ist ein weiterer Versuch dargestellt. Im Gegensatz zu den bisherigen Mischkultivationen sind die Acetat- und Methanproduktion getrennt. In einem ersten Fermenter wird *Acetobacterium woodii* kontinuierlich kultiviert (Versuch in Figur 17). Ein Teil der abgeführten Kultur dient als Medium für eine Mischkultur, welche in einem zweiten Fermenter gezüchtet wird. Mit dieser Anordnung ist es nun möglich, die spezifische Produktion durch *A. woodii* separat zu bestimmen. Auch der spezifische Verbrauch von Acetat der Mischkultur kann bestimmt werden. Den spezifischen Verbrauch von Acetat durch die Methanogenen zu bestimmen, ist hingegen nicht möglich, da der Biomasseanteil von *A. woodii* in Mischkultur nicht messbar ist. Auch die spezifische Methanproduktion ist deshalb auf das Trockengewicht der Mischkultur bezogen.



Figur 33: Verlauf der spezifischen Acetatproduktion q_{Ac} , des Trockengewichtsertrages E , des spezifischen Acetatverbrauches Q_{Ac} und der spezifischen Methanproduktion q_{CH_4} in Chemostatkultivation von *A. woodii* mit *Methanosarcina* sp. JKAD. ↓: Erhöhung der Verdünnungsrate D .

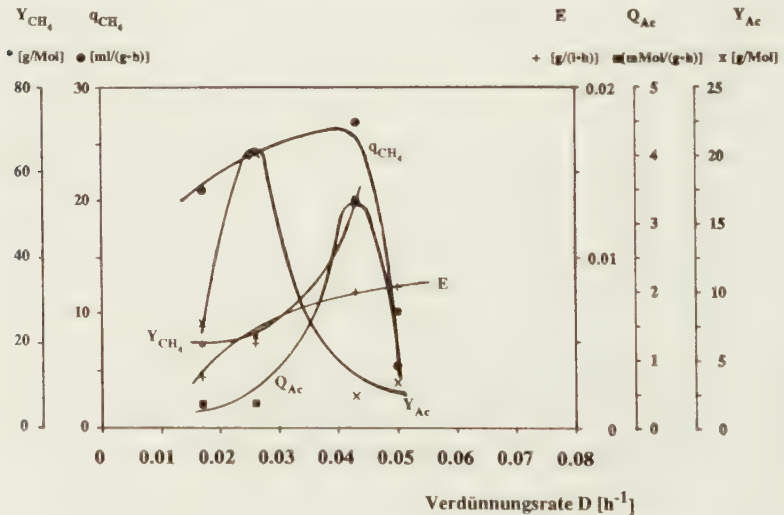
In **Figur 33** sind die spezifische Acetatproduktion von *A. woodii* (aus **Figur 17**), sowie die Biomasseproduktion, der spezifische Verbrauch von Acetat und die spezifische Methanproduktion der Mischkultur dargestellt. Die Verdünnungsrate D wird in 3 Schritten erhöht. Zu Beginn wird D auf 0.017 h^{-1} , nach 235 Stunden auf 0.026 h^{-1} , nach 402 Stunden auf 0.043 h^{-1} und nach 546 Stunden auf 0.050 h^{-1} eingestellt. Die Biomasseproduktion steigt schrittweise an, wie auch die spezifische Acetatproduktion. Bei der grössten Verdünnungsrate werden die methanogenen Bakterien ausverdünt, was an der stark absinkenden spezifischen Methanproduktion zu sehen ist. Die Ertragsausbeuten sind in **Figur 34** dargestellt. Der Biomasseertrag pro Mol verbrauchter Fructose und der Biomasseertrag pro Mol produziertem Acetat ist für die parallel betriebene Kultivierung von *Acetobacterium woodii* berechnet. Die Ertragsausbeuten zeigen zwar grössere Schwankungen, folgen aber ebenfalls den Erhöhungen der Verdünnungsrate.



Figur 34: Verlauf der Substratausbeuten $Y_{Fructose}$ und Y_{Acetat} , sowie der Produktausbeuten Y_{Acetat} und Y_{CH_4} im Chemostat zum Versuch in **Figur 34**. $\downarrow$: Erhöhung der Verdünnungsrate D .

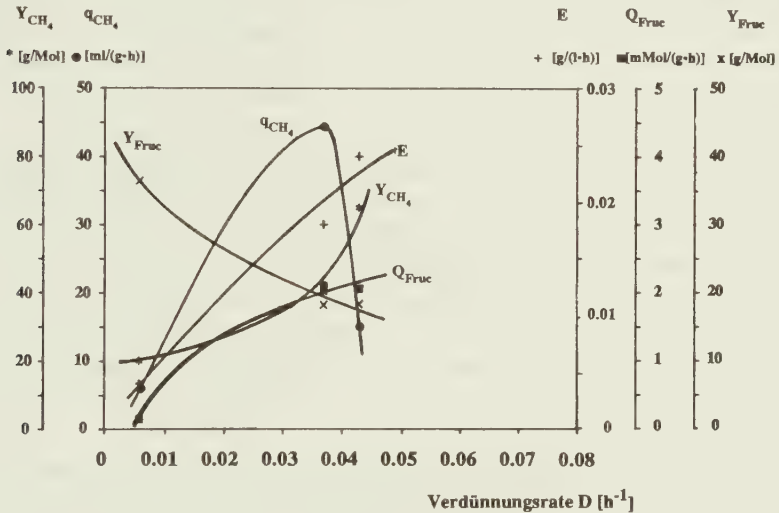
Die maximalen spezifischen Methanproduktionen erreichten Werte von 40 ml $\text{CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ im Batch und 45 ml $\text{CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ im Chemostaten für *A. woodii* mit *Methanosarcina* sp. DALS. Für die Mischkultur von *A. woodii* mit *Methansoarcina* sp. JKAD im Chemostaten konnte eine spezifische Methanproduktion von 27 ml $\text{CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ bestimmt werden.

In den Figuren 35 und 36 sind die spezifischen Variablen der Mischkultur in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate dargestellt. Die Biomasseproduktion E, die Acetatausbeute Y_{Ac} und die Methanausbeute Y_{CH_4} in Figur 35, bestimmt aus den Daten des vorher beschriebenen Versuches (Figuren 33 und 34), steigen mit erhöhter Verünnungsrate an. Ausser der Acetatausbeute (g Biomasse pro Mol verbrauchtem Acetat) zeigen diese Verläufe im gewählten Bereich kein Maximum, sind aber deutlich beeinflusst durch die Zufuhr von Substrat und *Acetobacterium woodii*.



Figur 35: Mischkultivation von *Acetobacterium woodii* mit *Methanosarcina* sp. JKAD. Abhängigkeit der Methanausbeute Y_{CH_4} , der spezifischen Methanproduktion q_{CH_4} , der Biomasseproduktion E , des spezifischen Acetatverbrauches Q_{Ac} und der Acetatausbeute Y_{Ac} von der Verdünnungsrate D . Bedingungen siehe Figuren 34 und 35.

Der spezifische Acetatverbrauch und die spezifische Methanproduktion zeigen ein Maximum. Die Werte fallen bei einer Verdünnungsrate $D > 0.048 \text{ h}^{-1}$ stark ab, was bedeutet, dass die methanogenen Bakterien selektiv ausgewaschen werden.



Figur 36: Mischkultivation von *Acetobacterium woodii* mit *Methanosarcina* sp. DALS. Abhängigkeit der Methanausbeute Y_{CH_4} , der spezifischen Methanproduktion q_{CH_4} , der Biomasseproduktion E , des spezifischen Fructoseverbrauches Q_{Fruc} und der Fructoseausbeute Y_{Fruc} von der Verdünnungsrate D . Bedingungen wie in den Figuren 31 und 32.

Der Verlauf der Fructoseausbeute und der Biomasseproduktion in Abhängigkeit der Verdünnungsrate in einer Mischkultivation von *A. woodii* mit *Methanosarcina* sp. DALS (Figur 36) ist den entsprechenden Größen in Figur 35 ziemlich ähnlich. Der spezifische Fructoseverbrauch erreicht kein Maximum, hingegen die spezifische Methanproduktion. Die spezifische Methanproduktion der Mischkultur sinkt nicht so deutlich wie diejenige in Figur 35. Die Mischkultur von *A. woodii* mit *Methanosarcina* Stamm DALS erreicht höhere spezifische Methanproduktionen und Trockengewichtserträge als die Kultur von *A. woodii* mit *Methanosarcina* Stamm JKAD.

5. DISKUSSION

Acetobacterium woodii wächst in Batchkultivation im Fermenter exponentiell und produziert Essigsäure, bis die Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle aufgebraucht ist. Werden der pH und das Redoxpotential nicht konstant gehalten, sinkt durch die Säurebildung der pH bis auf einen Wert von 4.5 (Figur 9). Gegenläufig zum pH - Verlauf steigt das Redoxpotential bis auf -180 mV an. Dieser Anstieg wird in erster Linie durch die Änderung des pH verursacht. Ohne Regelung, beziehungsweise ohne Redoxpuffer, zeigt sich somit eine deutliche pH - Abhängigkeit des Redoxpotentials, was auch von Zehnder (1978) gezeigt wurde. Wird dagegen der pH konstant gehalten, sinkt das Redoxpotential während der exponentiellen Phase des Wachstums und der Acetatproduktion ab. Die Bildung von Wasserstoff und Kohlendioxid während dieser Phase wird durch qualitative Analysen der Gaszusammensetzung bestätigt. In der stationären Phase des Wachstums erreicht das Redoxpotential wieder den Ausgangswert wie zu Beginn der Kultivation. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit dem von Braun (1979) vorgeschlagenen Weg der Homoacetatgärung bei *Acetobacterium woodii* (siehe auch Figur 4):

Die Fructose wird über das Phosphotransferasesystem unter gleichzeitiger Phosphorylierung zu Fructose-1-phosphat in die Zelle aufgenommen. Anschliessend wird der Phosphozucker im Fructosebisphosphatweg zu 2 Pyruvat abgebaut. Die Pyruvatdehydrogenase spaltet das Pyruvat, wobei Acetyl-CoA, CO₂ und Coenzym gebundener H₂ entstehen. Acetyl-CoA wird über Phosphotransacetylase und Acetatkinase zu Acetat umgewandelt. Die bei der Dehydrogenierung freiwerdenden Reduktionsäquivalente wandelt die Hydrogenase nach folgender Reaktionsgleichung um:



Kohlendioxid wird mit Wasserstoff über die Formiatdehydrogenase zu Acetat umgewandelt. Bei der Homoacetgärung von 1 Mol Fructose entstehen somit theoretisch 3 Mol Acetat. Durch die Assimilation eines Teils des CO₂ verschiebt sich dieser Wert auf 2.6 Mol Acetat/Mol Fructose (Braun & Gottschalk 1981). Wird durch Stickstoffbegasung das CO₂ ausgetrieben, so verschiebt sich dieser Wert auf 1.9 bis 2.2 Mol Acetat pro Mol Fructose (Tabelle 5). Überschüssige Reduktionsäquivalente werden dann über die Hydrogenase als Wasserstoff freigesetzt und verursachen eine Absenkung des

Redoxpotentials im Medium. *A. woodii* wird durch den entstehenden Wasserstoff, besonders bei gleichzeitigem CO₂ - Mangel, im Metabolismus und damit auch im Wachstum gehemmt. Dies ist auch von den obligat Protonen reduzierenden Bakterien bekannt (Mah 1982).

In Chemostatkultivation von *A. woodii* wurden die pH- und Temperaturabhängigkeiten untersucht, da diesbezügliche Charakterisierungen in der Literatur fehlten. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Temperatur	pH	D h ⁻¹	E gTG/(l·h)	Q _{Fruc} mMol/(gTG·h)	q _{Ac} mMol/(gTG·h)	Ac/Fruc Mol/Mol
30 °C	6.0	0.043	0.005	6.7	3.8	0.6
	7.0	0.11	0.010	n. b.	1.08	n. b.
	7.5	0.109	0.030	n. b.	0.9	n. b.
35 °C	6.0	0.042	0.003	3.32	6.23	1.9
	7.0	0.044	0.011	2.27	1.34	0.6
		0.087	0.015	5.29	2.62	0.5
		0.105	0.016	n. b.	1.57	n. b.
		0.111	0.037	n. b.	0.83	n. b.
	7.1	0.038	0.016	n. b.	1.09	n. b.
		0.121	0.012	n. b.	4.07	n. b.
	7.5	0.112	0.011	n. b.	1.55	n. b.
		0.113	0.025	n. b.	1.91	n. b.
	7.8	0.131	0.010	n. b.	1.1	n. b.
	8.0	0.129	0.041	1.87	1.17	0.6
40 °C	6.0	0.13	0.038	5.94	12.9	2.2
	7.0	0.112	0.030	6.24	11.7	1.9
	7.5	0.113	0.018	1.8	3.74	2.1

Tabelle 5: Spezifische Daten von *Acetobacterium woodii* in Monokultur. n. b.: nicht bestimmt, da die Messung von Fructose erst später möglich war. D: Verdünnungsrate, E: Trockengewichtsertrag, Q_{Fruc}: spezifischer Fructoseverbrauch, Q_{Ac}: spezifische Acetatproduktion.

Kultivationsbedingungen für maximale Werte in bezug auf Ertrag, spezifischen Fructoseverbrauch und spezifische Acetatproduktion werden bei pH 6.0, 40 °C und der Verdünnungsrate von $D = 0.13 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit $t_d = 5.7$ Stunden) erreicht. Generell kann zusammengefasst werden, dass die optimalen Kultivationsbedingungen bei einem pH zwischen 6.0 und 7.0 und einer Temperatur zwischen 35 °C und 40 °C liegen dürften. Für die spätere Mischkultivation wurden Bedingungen, unter der Berücksichtigung der Angaben für die methanogenen Bakterien aus der Literatur (siehe **Tabelle 1**), von pH 6.5 bis 7.0 und 35 °C gewählt.

In der **Tabelle 6** sind die in dieser Untersuchung ermittelten Daten denjenigen aus der Literatur gegenübergestellt. Der Vergleich der Kultivationen von *A. woodii* zeigt, dass höhere Biomasseausbeuten pro Mol verbrauchtem Substrat oder Produkt erreicht worden sind. Vergleichbare Kultivationsbedingungen mit kontinuierlicher Begasung, pH- und redoxkontrollierter Fermenterkultivation sind bei Kreikenbohm & Pfennig (1985) beschrieben. Allerdings diente dort 3,4,5 Trimethoxybenzoat als Substrat, was den Vergleich erschwert.

Organismus ^a	Bedingungen			Q_S	Y_S	Q_P	Y_P	Bemerkungen ^b	Ref
	K ^c	Temp.	pH						
<i>A. woodii</i> WB1	Fl,B	30 °C	7.0	- d	68	-	-	-	14
<i>A. woodii</i> NZVal6	Fe,C	30	6.9	-	35	-	-	$K_S = 1.07 \text{ mM}^e$ $\mu_{\max} = 0.112/\text{h}$	39
<i>A. woodii</i> WB1	Fe,B	30	6.8	-	28.9	-	9.98	-	88
<i>A. woodii</i> WB1	Fe,C	40	7.0	6.24	14.7	11.7	4.4	-	d. A. f

Tabelle 6: Vergleich der in dieser Arbeit mit *Acetobacterium woodii* ermittelten spezifischen Daten mit den in der Literatur beschriebenen Werten. Q_S : spezifischer Substratverbrauch ($\text{mMol}/(\text{gTG} \cdot \text{h})$); Y_S : Substratausbeute (gTG/Mol); Q_P : spezifische Acetatproduktion ($\text{mMol}/(\text{gTG} \cdot \text{h})$); Y_P : Produktausbeute (gTG/Mol Acetat).

a Abkürzung A. für *Acetobacterium*; b: K_S Sättigungskonstante, $\mu_{\max}$ max. spezifische Wachstumsrate, das Substrat ist Fructose, Ausnahme siehe e; c Kultivationsbedingungen: Fl: Flaschen- oder Fe: Fermenterkultivation, B: Batch- oder C: Chemostatverfahren; d: nicht angegeben; e: Als Substrat 3,4,5 Trimethoxybenzoat; f: d. A.=diese Arbeit.

Die methanogenen Bakterien *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS konnten erst nach langer Adaptationsphase von 3 - 6 Wochen im Fermenter gezüchtet werden. Von ähnlich langen Adaptationsphasen berichten auch andere Autoren (Mah et al. 1978, Smith & Mah 1978, 1980, Smith et al. 1980, Zeikus 1983). Ein Wechsel des Substrates bedingt andere Energieausbeuten und beeinflusst damit das Wachstum. Der Übergang von H_2/CO_2 zu Acetat verringert die Energieausbeute von $\Delta G^0 = -131 \text{ kJ/Mol } (H_2/CO_2)$ auf -36 kJ/Mol (Acetat) (nach Taylor 1982).

Für die Energiegewinnung aus Acetat sind noch keine bestimmten Mechanismen bewiesen. Nach Lancaster (1986) soll über ein sogenanntes "acetatsplattendes Zentrum" Methanol und Kohlenmonoxid entstehen. Methanol wird von der Methylreduktase, dem Schlüsselenzymkomplex der Methanogenese, zu Methan reduziert. Die dazu nötigen Elektronen werden aus der Oxidation des Kohlenmonoxid zu Kohlendioxid durch die Kohlenmonoxiddehydrogenase geliefert und durch einen noch unbekannten Elektronenüberträger auf die Methylreduktase übertragen. Ein Mol Acetat wird zu 1 Mol Methan und 1 Mol Kohlendioxid, dabei wird gleichzeitig ein Mol ATP gebildet. Zehnder & Brock (1979) schlagen ein Modell vor, wonach ATP chemiosmotisch gebildet wird. Die Bildung eines pH - Gradienten und die Energetisierung der Cytoplasmamembran ermöglichen in Verbindung mit einer ATPase die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat.

Nach Wandrey & Aivasisdis (1983) gehen 97 % des Kohlenstoffs von Acetat in die Produkte CH_4 und CO_2 und nur 3 % in die Biomasse. Die gemessenen Trockengewichtserträge in Chemostatkultivation von 4 - 6 mgTG/(l·h) stimmen mit den geringen Acetatassimilationen überein.

Methanosarcina sp. JKAD und DALS bilden während des Wachstums verschiedene Morphotypen. In kaum wachsenden Kulturen, z. B. zu Beginn und am Ende der Kultivation, sind kleine kokkenförmige Zellen und grosse hüllenartige Strukturen im Mikroskop sichtbar, während bei aktiver Methanproduktion vorwiegend klumpige Sarcinapakete vorkommen. Alle diese Morphotypen waren sehr ähnlich mit jenen beschrieben von Zhilina (1976), Mah (1980) und Robinson et al. (1986). Ein Lebenszyklus, wie dies Robinson (1986) von *Methanosarcina mazei* berichtete, konnte hingegen nicht beobachtet werden. In kontinuierlicher Kultivation treten die oben beschriebenen morphologischen Typen gleichzeitig auf. Die Bildung von grossen

Sarcinapaketen, bei gleichzeitig erhöhter Methanproduktion, wird vor allem beobachtet, wenn Kalziumdiacetat die C- und Energiequelle ist. Diese Beobachtung scheint im Gegensatz zu den Beschreibungen von Scherer et al. (1986) mit *Methanosarcina barkeri* Stamm Jülich zu stehen, wo mit Methanol als Substrat bei fehlendem Kalziumangebot das Bakterium vermehrt Flocken bildet und weniger Methan produziert. Der physiologische und biochemische Zusammenhang ist noch nicht genau untersucht, möglicherweise sind diese Phänomene auf unterschiedliche Neutralzuckergehalte in der Heteropolysaccharid - Zellwand zurückzuführen (Scherer et al. 1986).

Auch bei den methanogenen Kulturen ist der Vergleich der Daten mit Literaturwerten (Tabelle 7) nur beschränkt möglich, weil auch hier die Kultivationsbedingungen unterschiedlich sind.

Organismus ^a	Bedingungen			Q _S	Y _S	Q _P	Y _P	K _s ^b mM	Ref.
	K ^c	Temp.	pH						
TAM Organismus	Fl,B	60	7.3	- d	2.3	-	-	0.8	2
<i>M'thrix soehngenii</i> Opfikon	Fl,B	37	7.5	1.63	-	1.46	-	0.7	34
<i>M'thrix conciliü</i> GP6	Fl,B	35	7.2	-	1.1	-	0.8	1.2	57
<i>M'sarcina barkeri</i> MS	Fe,B	37	7.0	-	-	3.6	3.88	-	40
<i>M'sarcina barkeri</i> DM	Fl,B	37	7.0	-	-	-	4.4	-	52
<i>M'sarcina barkeri</i> 227	Fl,B	35	7.0	-	2.1	5.8	2.1	5	70
<i>M'sarcina barkeri</i> 227	Fe,B	35	6.8	-	2.7	-	-	-	76
<i>M'sarcina barkeri</i> MS	Fe,B	35	6.8	-	1.2	-	-	-	76
<i>M'sarcina barkeri</i> Fusaro	Fl,B	30	6.2	-	4.2	-	-	-	66
<i>M'sarcina barkeri</i> Fusaro	Fe,C	37	6.3	5.7	1.53	4.9	-	4.1	84
<i>M'sarcina</i> CHTI 55	Fl,B	55	6.8	-	1.4	-	1.47	9.6	79
<i>M'sarcina thermophila</i> TM1	Fl,B	50	6.8	-	-	-	1.8	4.5	100
<i>M'sarcina thermophila</i> TM1	Fe,B	58	6.8	-	1.7	-	-	-	76
<i>M'sarcina acetivorans</i>	Fe,B	35	6.8	-	2.4	-	-	-	76
<i>M'sarcina</i> JKAD	Fe,B	35	7.0	-	-	4.5	-	-	d.A. ^e
<i>M'sarcina</i> DAL5	Fe,B	35	6.5	-	-	12.1	-	-	d.A.
<i>M'sarcina</i> JKAD	Fe,C	35	7.0	22.8	0.9	3.3	5.6	-	d.A.

Tabelle 7: Vergleich der in dieser Arbeit mit methanogenen Bakterien ermittelten spezifischen Daten mit den in der Literatur beschriebenen Werten. Q_S: spezifischer Acetatverbrauch (mMol/(gTG·h)); Y_S: Acetatausbeute (gTG/Mol); Q_P: spezifische Produktion von Methan (mMol/(gTG·h)); Y_P: Methanausbeute (gTG/Mol CH₄).

a: Abkürzung *M'* für *Methano*; b: K_s Sättigungskonstante bezüglich Acetat; c: Kultivationsbedingungen: Fl: Flaschen- oder

Fe: Fermenterkultivation B: Batch- oder C: Chemostatverfahren; d: nicht angegeben; e: d.A.=diese Arbeit.

Die spezifischen Werte der Methanproduktion, der Produktausbeute und der Substratausbeute stimmen mit den Werten aus der Literatur weitgehend überein. Hingegen liegt der spezifische Verbrauch von Acetat von 22.8 mMol/(gTG•h) in dieser Arbeit 4 mal höher als unter ähnlichen Kultivationsbedingungen mit *Methanosarcina barkeri* Stamm Fusaro (Wandrey & Aivasidis 19883).

In Batchkultivation produzieren die untersuchten Methanbakterien bis zu 270 ml CH₄/(gTG•h). Das Wachstum und die spezifische Methanproduktion verlaufen exponentiell bis das Acetat verbraucht ist. Die spezifische Methanproduktion ist in Chemostatkultivation geringer als in Batchkultivation. Sie beträgt 20 - 75 ml CH₄/(gTG•h) [0.9 - 1.8 mMol/(gTG•h)] bei Verdünnungsraten von D = 0.024 bis 0.035 h⁻¹, wobei nur wenig Acetat umgesetzt wird.

In kontinuierlicher Kultivation blieben die Mischkulturen stabil über Zeiträume von mehr als 600 Stunden. Die Begasung mit Stickstoff ermöglicht, die hemmende Wirkung des in der Vergärung der Fructose entstehenden Wasserstoffs zu verringern. Der für *A. woodii* notwendige *interspecies hydrogen transfer*, die Übertragung des Wasserstoffs von *A. woodii* auf die methanogenen Bakterien, wird durch die Begasung verringert. Die acetatverwertenden Methanogenen, hier die *Methanosarcina* Arten, können daher nicht das energie günstigere Substrat H₂/CO₂ nutzen. Dieser Wechsel würde eine Änderung des Enzymapparates der Zellen bewirken. Ist H₂ und CO₂ aufgebraucht, dauert es lange, bis die zur Acetatverwertung nötigen Enzyme wieder synthetisiert sind.

Bei einer Verdünnungsrate von D = 0.037 h⁻¹ (t_d = 18.7 h) erreicht die maximale Methanproduktionsrate für *A. woodii* mit *Methanosarcina* sp. DALS einen Wert von 45 ml CH₄/(gTG•h). Für *A. woodii* und *Methanosarcina* sp. JKAD beträgt der Wert 27 ml CH₄/(gTG•h), bei einer Verdünnungsrate von D = 0.043 h⁻¹ (t_d = 16.1 h).

Die Resultate sind zusammen mit Literaturdaten in Tabelle 8 dargestellt. Auch für Mischkulturen liegen nur sehr wenige Vergleichsdaten vor. Angefügt sind deshalb noch Daten einer Arbeit mit Klärschlamm, d. h. einer nicht definierten Mischkultur. Die Kultivationsbedingungen waren hier sehr ähnlich und auch die Werte der spezifischen Methanproduktion zeigen gute Übereinstimmung.

Organismus ^a	Bedingungen K ^b Temp. pH			Q _S	Y _S	Q _P	Y _P	Substrat	Ref.
<i>A. woodii</i> WB1 <i>M'bacterium formicicum</i> MF <i>M'sarcina barkeri</i> 227 <i>Escherichia coli</i> <i>D. vulgaris</i> JJ	IA	37	7.0	- c	-	0.25	-	Saccharose	36
<i>D. vulgaris</i> Hildenborough <i>M'sarcina barkeri</i> MS	Fe,C	30	7.0	-	5.3 6.3	-	-	Lactat Pyruvat	80
<i>A. woodii</i> WB1 <i>M'sarcina</i> JKAD	Fe,C	35	7.0	3.35	2.4	1.2	52.5	Acetat ^d	d.A. ^e
<i>A. woodii</i> WB1 <i>M'sarcina</i> DAL5	Fe,C	35	6.5	2.1	18.2	1.98	40.1	Fructose	d.A.
Klärschlamm	Fe,C	37	7.2	1.48	-	1.04	4.0	Acetat	55

Tabelle 8: Vergleich der in dieser Arbeit mit Mischkulturen ermittelten spezifischen Daten mit den in der Literatur beschriebenen Werten. Q_S: spezifischer Substratverbrauch (mMol/(gTG•h)); Y_S: Substratausbeute (gTG/Mol); Q_P: spezifische Produktion von Methan (mMol/(gTG•h)); Y_P: Methanausbeute (gTG/Mol CH₄).

a: Abkürzungen A. für *Acetobacterium*, M' für *Methano*, D. für *Desulfovibrio*; b Kultivationsbedingungen: Fl: Flaschen- oder Fe: Fermenterkultivation, B: Batch- oder C: Chemostatverfahren, IA: Immobilisiert in Agar; c: nicht angegeben; d: Spezialverfahren siehe Figuren 33, 34 und 35; e: d.A.=diese Arbeit.

Unter Berücksichtigung dieser eingeschränkten Vergleichsmöglichkeiten liegen die in dieser Arbeit ermittelten Daten in denselben Größenordnungen wie jene in der Literatur. Aus den vorliegenden Daten lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Acetobacterium woodii vergärt theoretisch 1 Mol Fructose in der Homoacetatgärung zu 3 Mol Acetat. Zwei Acetat entstehen aus Pyruvat, ein Acetat wird aus Kohlendioxid und Wasserstoff gebildet. Die Fixierung des Kohlenstoffs in das Zellmaterial erfolgt via CO₂ durch einen noch nicht genau bekannten Weg (Fuchs 1986). Die kontinuierliche Stickstoffbegasung beeinflusst das Wachstum und den Umsatz von Fructose zu Acetat von *Acetobacterium woodii*. Die Begasung verhindert nur teilweise die Hemmung des Substratumsatzes durch den bei der Gärung von Fructose entstehenden Wasserstoff. Somit ergeben sich kleinere Biomasseausbeuten aus dem Substrat und geringere Produktbildungsraten. Auch das Kohlendioxid wird durch die Begasung ausgetrieben, wodurch sich die Biomasseproduktion noch mehr verringern muss.

Die Kultivierung von *Methanosarcina* Stamm JKAD und Stamm DALS ist durch lange Adaptationsphasen gekennzeichnet. Das Wachstum und der Umsatz von Acetat zu Methan und Kohlendioxid erfolgen mit kleinen Raten. Dies ist vor allem bedingt durch die geringe Ausbeute an Energie beim Umsatz des Substrates Acetat zu Methan und Kohlendioxid.

In Mischkultur produziert *Acetobacterium woodii* aus Fructose Acetat, welches von von *Methanosarcina* sp. DALS bzw. JKAD zu Methan und Kohlendioxid umgesetzt wird. Die Umsatz- und Wachstumsbeschränkungen für *A. woodii* in Monokultur gelten auch für die Mischkultur. *A. woodii* wächst wesentlich schneller als die Methanogenen und erreicht um einen Faktor 10 - 20 höhere Zelldichten. Die Methanbakterien können die gebildete Essigsäure nur in Batchkultur vollständig zu CH_4 und CO_2 abbauen, wie bei Winter & Wolfe (1979) in Flaschenkulturen. Im Chemostaten bewirken die grösseren spezifischen Wachstums- und Umsatzraten auf Fructose von *A. woodii* gegenüber den Methanogenen, dass nur ein Teil des Acetates zu Methan und Kohlendioxid abgebaut wird. Wasserstoff, gebildet von *A. woodii*, kann die acetatverwertenden Methanbakterien im Wachstum und in der Methanogenese hemmen (McInerney & Bryant 1981, Ferguson & Mah 1983 und Baresi 1984).

Der spezifische Verbrauch von Fructose und die spezifische Methanproduktion als Variablen beschreiben den Zustand von *A. woodii* und *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS in Misch- wie Monokultur.

In der Weiterführung dieser Untersuchung ist ein Ansatz eines Modelles für die Mischkultivierung, etwa nach der Art von Andrews & Graef (1971), Powell (1984, 1985) oder Archer & Powell (1985) möglich. Damit könnte die Mischkultur rechnerisch geführt und weiter optimiert werden. Voraussetzungen wären der vollständig bekannte Weg der Kohlenstofffixierung der beteiligten Mikroorganismen, die Bestimmung der Substratsättigungskonstante K_s , der maximalen spezifischen Wachstumsrate $\mu_{\max}$, des Erhaltungskoeffizienten m und die Bestimmung der Wasserstoffhemmkonstante K_I beider Bakterien und der Massetransferkonstanten K_L a für Wasserstoff.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Acetobacterium woodii WB1, *Methanosarcina* Stamm JKAD und *Methanosarcina* Stamm DALS wurden unter pH-, redox- und temperaturkontrollierten Bedingungen im Fermenter gezüchtet. Der Umsatz von Fructose zu Acetat mit *A. woodii* wurde in kontinuierlicher Kultur bei verschiedenen pH- und Temperaturwerten untersucht. Die Methanproduktion aus Acetat mit *Methanosarcina* Stamm JKAD und DALS wurde in Batch- und Chemostatkultivation bestimmt. Der Umsatz von Fructose zu Methan in Mischkultivation von *A. woodii* mit *Methanosarcina* Stamm JKAD bzw. DALS wurde untersucht.

Es wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

— *Acetobacterium woodii* in Monokultur

- Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.13 \text{ h}^{-1}$, pH 6.0, Temperatur von 40°C und $E_h = -350 \text{ mV}$ erreichten der Biomassertrag $E = 0.038 \text{ g Trockengewicht/(l}\cdot\text{h)}$, der spezifische Fructoseverbrauch $Q_{\text{Fruc}} = 5.94 \text{ mMol/(gTG}\cdot\text{h)}$ und die spezifische Acetatproduktion $q_{\text{Ac}} = 12.9 \text{ mMol/(gTG}\cdot\text{h)}$. Aus einem Mol Fructose bildete *A. woodii* unter diesen Bedingungen 2.2 Mol Acetat.

— *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS

- *Methanosarcina* Stamm JKAD produzierte in Batchkultivation $4 - 4.5 \text{ mMol CH}_4\text{/(gTG}\cdot\text{h)}$, bei pH 7.0, 35°C und $E_h -520 \text{ mV}$. Die spezifische Wachstumsrate μ betrug 0.011 h^{-1} , entsprechend einer Verdopplungszeit von $t_d = 63$ Stunden. In Chemostatkultivation wurden bis $3.1 \text{ mMol CH}_4\text{/(gTG}\cdot\text{h)}$ und $1 \text{ mg Trockengewicht/(l}\cdot\text{h)}$ produziert, bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.031 \text{ h}^{-1}$, pH 7.0, 35°C und $E_h -250 \text{ mV}$. Der spezifische Acetatverbrauch lag bei $24 \text{ mMol/(gTG}\cdot\text{h)}$.
- *Methanosarcina* Stamm DALS bildete in Batchkultivation bei pH 6.5, 35°C und $E_h -600 \text{ mV}$ maximal $12.1 \text{ mMol CH}_4\text{/(gTG}\cdot\text{h)}$. Die spezifische Wachstumsrate betrug $\mu = 0.043 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit $t_d = 16.1 \text{ h}$).

— Mischkultivation von *Acetobacterium woodii* mit *Methanosarcina* sp. JKAD und DALS:

- *A. woodii* und *Methanosarcina* Stamm DALS produzierten in Batchkultivation maximal $1.9 \text{ mMol CH}_4/(\text{gTG}\cdot\text{h})$. Die Mischkultur setzte dabei Fructose vollständig zu Methan und Kohlendioxid um.
- In kontinuierlicher Kultur erreichten *A. woodii* und *Methanosarcina* Stamm JKAD eine maximale spezifische Methanproduktion von $1.2 \text{ mMol}/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.043 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 16.1 \text{ h}$). Die kontinuierliche Kultivation von *A. woodii* mit *Methanosarcina* Stamm DALS erreichte eine maximale spezifische Methanproduktion von $2 \text{ mMol}/(\text{gTG}\cdot\text{h})$ bei einer Verdünnungsrate von 0.037 h^{-1} ($t_d = 18.7 \text{ h}$).
- Auswaschungsphänomene der methanogenen Bakterien in Mischkultur traten bei Verdünnungsraten von $D > 0.050 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 13.9 \text{ h}$) mit *Methanosarcina* Stamm JKAD und von $D > 0.043 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 16.4 \text{ h}$) mit *Methanosarcina* Stamm DALS auf.
- Stabile Mischkultivationen mit Verdünnungsraten zwischen 0.006 h^{-1} und 0.043 h^{-1} konnten bis zu 600 Stunden betrieben werden.

7. ANHANG

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis:

<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i>
Ac_i	Acetatkonzentration im Zulauf [mM]
Ac_n	Acetatkonzentration im Fermenter zur Zeit n [mM]
A660	Absorption bei 660 nm.
D, D_n	Verdünnungsrate zur Zeit n [h^{-1}]
E	Trockengewichtsertrag [g/(l·h)]
F	Fluss des Mediums [l/h]
$F_{CH_4,n}$	Methanfluss zur Zeit n [ml/h, mMol/h]
$Fruc_i$, $Fruc_n$	Fructosekonzentration im Fermenter zur Zeit n [mM]
$\Delta G^{0'}$	freie Energie der Reaktion unter Standardbedingungen bei pH 7.0 [J/Mol]
K_i	Inhibitorkonstante [mM]
K_{La}	Massetransferkoeffizient [h^{-1}]
K_s	Substratsättigungskonstante [mM]
m	Erhaltungskoeffizient [Mol/(l·h)]
<i>M'</i>	<i>Methano</i>
P_{Ac} , $P_{Ac,n}$	Acetatproduktion zur Zeit n [mMol/(l·h)]
P_{CH_4} , $P_{CH_4,n}$	Methanproduktion zur Zeit n [ml/(l·h), mMol/(l·h)]

q_{Ac}	spezifische Acetatproduktion [mMol/(gTG•h)]
q_{CH_4}	spezifische Methanproduktion [ml/(gTG•h), mMol/(gTG•h)]
Q_{Ac}	spezifischer Acetatverbrauch [mMol/(gTG•h)]
Q_{Fruc}	spezifischer Fructoseverbrauch [mMol/(gTG•h)]
t_d	Verdopplungszeit [h]
TG, TG _n	Trockengewicht zur Zeit n [g/l]
V, V _n	Kulturvolumen zur Zeit n [l]
V _{Ac} , V _{Ac,n}	Acetatverbrauch zur Zeit n [mMol/(l•h)]
V _{Fruc} , V _{Fruc,n}	Fructoseverbrauch zur Zeit n [mMol/(l•h)]
Y _{Fruc}	Ausbeutekoeffizient für verbrauchte Fructose [gTG/Mol]
Y _{Ac}	Ausbeutekoeffizient für produziertes Acetat [gTG/Mol]
Y _{Ac}	Ausbeutekoeffizient für verbrauchtes Acetat [gTG/Mol]
Y _{CH₄}	Ausbeutekoeffizient für produziertes Methan [gTG/Mol]
ZZ	Zellzahl [N/ml]
μ	spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]

7. LITERATURVERZEICHNIS

01. **Abram J.W. and D. B. Nedwell** 1978
Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen.
Arch. Microbiol. **117**, 89-92
02. **Ahring B. K. and P. Westermann** 1985
Methanogenesis from acetate: Physiology of a thermophilic acetate - utilizing methanogenic bacterium.
FEMS Microbiol. Lett. **28**, 15-20
03. **Andrews J. F. and ST. P. Graef** 1971
Dynamic modeling and simulation of the anaerobic digestion process.
Adv. Chem. Ser. **105**, 126-162
04. **Archer D. B. and G. E. Powell** 1985
Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen.
Arch. Microbiol. **141**, 133-137
05. **Balch W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe** 1979
Methanogens: Reevaluation of a unique biological group.
Microb. Review **43**, 260-296
06. **Balch W. E., S. Schobert, R. S. Tanner and R. S. Wolfe** 1977
Acetobacterium, a new genus of hydrogen - oxidizing, carbondioxide reducing, anaerobic bacteria.
Int. J. Syst. Bacteriol. **27**, 355-361
07. **Baresi L.** 1984
Methanogenic cleavage of acetate by lysates of Methanosarcina barkeri.
J. Bacteriol. **160**, 365-370
08. **Barker H. A.** 1936
Studies on methane producing bacteria.
Arch. Microbiol. **7**, 420-438
09. **Barker H. A.** 1940
Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of Methanobacterium omelianskii.
Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. **6**, 201-220

10. **Barker H. A.** 1956
Bacterial fermentations.
John Wiley and Sons, New York.
11. **Boone D. R.** 1984
Mixed - culture fermentor for simulating methanogenic digestors.
Appl. Environ. Microbiol. **48**, 122-126
12. **Brandl H.** 1986
Mikrobielle Prozesse unter oxidationsmittel-limitierten Bedingungen an der Sediment - Wasser - Übergangszone in Seen.
Dissertation Universität Zürich (im Druck).
13. **Braun K.** 1979
*Untersuchungen zum autotrophen, heterotrophen und mixotrophen Wachstum von *Acetobacterium woodii* und *Clostridium aceticum*.*
Dissertation Universität Göttingen.
14. **Braun K. and G. Gottschalk** 1981
*Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*.*
Arch. Microbiol. **128**, 294-298
15. **Brock T. D. and K. O'Dea** 1977
Amorphous ferrous sulfide as a reducing agent for culture of anaerobes.
Appl. Environ. Microbiol. **33**, 254-256
16. **Bryant M. P.** 1972
Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria.
Am. J. Clin. Nutr. **25**, 1324-1328
17. **M. P. Bryant, E. A. Wolin, M. J. Wolin and R. S. Wolfe** 1967
**Methanobacillus omelianskii* a symbiotic association of two species of bacteria.*
Arch. Mikrobiol. **59**, 20 -31
18. **Cappenberg TH. E.** 1975
A study of mixed continous cultures of sulfate - reducing and methane producing bacteria.
Microbiol. Ecol. **2**, 60-72
19. **Daniels L.** 1984
Biological methanogenesis: Physiological and practical aspects.
Trends in Biotechnol. **2**, 91-98
20. **Diekert G. und M. Ritter** 1982
*Nickel requirement of *Acetobacterium woodii*.*
J. Bacteriol. **151**, 1043-1045

21. **Dubach A. CH.** 1981
Charakterisierung einer Reinkultur methanogener Bakterien.
Diplomarbeit Universität Zürich.
22. **Dubach A. CH. and R. Bachofen** 1985
Methanogens: A short taxonomic overview.
Experientia **41**, 441-446
23. **Ferguson TH. J. and R. A. Mah** 1983
*Effect of H_2 - CO_2 on methanogenesis from acetate or methanol in *Methanosarcina* spp.*
Appl. Environ. Microbiol. **46**, 348-355
24. **Frischknecht K.** 1978
*Physiologische Reaktionen der Blaualge *Anacystis nidulans* auf Biozide als Grundlage für einen Biotest.*
Dissertation Universität Zürich.
25. **Fuchs G.** 1986
 CO_2 -fixation in acetogenic bacteria: Variations on a theme.
FEMS Microbiol. Rev. **39**, 181-213
26. **Hansson G. and N. Molin** 1981
End product inhibition in methane fermentations: Effect of carbon dioxide and methane on the methanogenic bacteria utilizing acetate.
Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol. **13**, 236-241
27. **Hansson G. and N. Molin** 1981
End product inhibition in methane fermentations: Effect of carbon dioxide on fermentative and acetogenic bacteria.
Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol. **13**, 242-247
28. **Harrison D. E.** 1978
Mixed cultures in industrial fermentation processes.
Adv. Appl. Microbiol. **24**, 129-164
29. **Hippe H., D. Caspari, K. Fiebig and G. Gottschalk** 1979
*Utilization of trimethylamine and other N - methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*.*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 494-498.
30. **Hoppe - Seyler F.** 1876
Über die Prozesse der Gärungen und ihre Beziehung zum Leben der Organismen.
Pflügers Arch. ges. Physiol. **12**, 1-17

31. **Hoppe - Seyler F.** 1886
Über die Gärung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. 2. Der Zerfall der Cellulose durch Gärung unter Bildung von Methan und Kohlensäure und die Erscheinungen, welche dieser Process veranlasst.
Z. Physiol. Chem. **10**, 401-440
32. **Hoppe - Seyler F.** 1887
Die Methangärung der Essigsäure.
Z. Physiol. Chem. **11**, 561-568
33. **Hungate R. E.** 1969
A roll tube method for cultivation of strict anaerobes.
In: Norris J.R. and D.W. Ribbons (eds.): Methods in microbiology, Vol **3B**, Academic Press, New York, Chapt. IV, 117-132
34. **Huser B.A., K. Wuhrmann and A.J.B. Zehnder** 1982
Methanothrix soehngenii gen. nov., sp. nov., a new acetotrophic, non hydrogen oxidizing methane bacterium.
Arch. Microbiol. **132**, 1-9
35. **Iannotti E. L., D. Kafkewitz, M. J. Wolin and M. P. Bryant** 1973
Glucose fermentation of Ruminoccus albus grown in continous culture with Vibrio succinogenes.
J. Bacteriol. **114**, 1231-1240
36. **Jones W. J., J. P. Guyot and R. S. Wolfe** 1984
Methanogenesis from sucrose by defined immobilized consortia.
Appl. Environ. Microbiol. **47**, 1-6
37. **Klass D. L.** 1984
Methane from anaerobic fermentation.
Science **233**, 1021-1028
38. **Kluyver A. J. and Ch. G. T. P. Schnellen** 1947
On the fermentation of carbon monoxide by pure cultures of methane bacteria.
Arch. Biochem. **14**, 57-70
39. **Kreikenbohm R. and N. Pfennig** 1985
Anaerobic degradation of 3,4,5-trimethoxybenzoate by a defined mixed culture of Acetobacterium woodii, Pelobacter acidigallici and Desulfobacter postgatei.
FEMS Microbiol. Ecol. **31**, 29-38
40. **Krzycki J. A., R. H. Wolkin and J. G. Zeikus** 1982
Comparison of unitrophic and mixotrophic substrate metabolism by an acetate adapted strain of Methansarcina barkeri.
J. Bacteriol. **149**, 247-254

41. **Lancaster J. R. jr.** 1986
A unified scheme for carbon and electron flow coupled to ATP synthesis by substrate level phosphorylation in the methanogenic bacteria.
FEBS Lett. **199**, 12-18
42. **Lawrence A. W.** 1971
Application of process kinetics to design of anaerobic processes.
Adv. Chem. Ser. **105**, 163-189
43. **Leigh J. A., F. Mayer and R. S. Wolfe** 1981
Acetogenium kivui, a new thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium.
Arch. Microbiol. **129**, 275-280
44. **Mah R. A.** 1980
Isolation and Characterization of Methanococcus mazei.
Curr. Microbiol. **3**, 321-326
45. **Mah R. A.** 1981
The methanogenic bacteria, their ecology and physiology.
In: A. Holländer (ed.): Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals.
Basic Life Sciences Vol **18**, 357-374
46. **Mah R. A** 1982
Methanogenesis and methanogenic partnerships.
Phil. Trans. Roy. Soc. London **B 297**, 499-516
47. **Mah R. A. and M. R. Smith** 1981
The methanogenic bacteria.
In: Starr M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel (eds.): The prokaryotes, Springer Berlin, 948-977
48. **Mah R. A., M. R. Smith and L. Baresl** 1978
Studies on an acetate fermenting strain of Methanosarcina.
Appl. Environ. Microbiol. **35**, 1174-1184
49. **Mah R. A., D. M. Ward, L. Baresi and T. L. Glass** 1977
Biogenesis of methane.
Ann. Rev. Microbiol. **31**, 309-341
50. **McInerney M. J. and M. P. Bryant** 1981
Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associates of Methanosarcina barkeri and Desulfovibrio species and effect of H₂ on acetate degradation.
Appl. Environ. Microbiol. **41**, 346-354

51. **McInerney M. J., M. P. Bryant and N. Pfennig 1979**
Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens.
Arch. Microbiol. **122**, 129-135
52. **Mountfort D. O. and R. A. Asher 1979**
*Effect of inorganic sulfide on the growth and metabolism of **Methanosarcina barkeri** strain DM.*
Appl. Environ. Microbiol. **37**, 670-675
53. **Muster P., A. Binder, K. Schneider and R. Bachofen 1983**
*Influence of temperature and pH on the growth of the thermophilic cyanobacterium **Mastigocladus laminosus** in continuous culture.*
Plant & Cell Physiol. **24**, 273-280
54. **Mylroie R. L. and R. E. Hungate 1954**
Experiments on the methane bacteria in sludge.
Can. J. Microbiol. **1**, 55-64
55. **Nishio N., T. K. Mazumder and S. Nagai 1984**
Methane production from formate, methanol and acetate in chemostat culture.
J. Ferment. Technol. **62**, 487-491
56. **Omelianskii V. L. 1916**
Fermentation méthanique de l'alcool éthylique.
Annals Inst. Pasteur Paris **30**, 56-60
57. **Patel G. B. 1985**
*Charcterization and nutrional properties of **Methanothrix concilii** sp. nov., a mesophilic aceticlastic methanogen.*
Can. J. Microbiol. **30**, 1383-1396
58. **Powell G. E. 1984**
Equalization of specific growth rates for syntrophic associations in batch cultures.
J. Chem. Tech. Biotechnol. **34B**, 97-100
59. **Powell G. E. 1985**
Stable coexistence of syntrophic associations in continuous culture.
J. Chem. Tech. Biotechnol. **35B**, 46-50
60. **Robinson R. W. 1986**
*Life cycles in the methanogenic archaeobacterium **Methanosarcina mazei**.*
Appl. Environ. Microbiol. **52**, 17-27
61. **Robinson R.W., H. C. Aldrich, ST. F. Hurst and S. Bleiweis 1985**
*Role of cell surface of **Methanosarcina mazei** in cell aggregation.*
Appl. Environ. Microbiol. **49**, 321-327

62. Rose C. S. and S. J. Pirt 1979
Production of methane by a Mycoplasma grown on glucose in chemostat culture.
Soc. Gen. Microbiol. Q 6, 91-92
63. Scherer P. A., H. P. Bochem, J. D. Davis and D. C. White 1986
Flocculation in methanogens, a comparative study of Methanosarcina strains Jülich and Fusaro.
Can. J. Microbiol. 32, 137-144
64. Scherer P., H. P. Bochem, H. Lippert und G. Wolff 1982
Das Spurenelementbedürfnis methanbildender Bakterien und die atomare Zusammensetzung von 10 Arten.
In: 5. Symp. Techn. Mikrobiologie, Berlin; H. Dellweg (Ed.) Verlag Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie im Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Berlin. 10-16
65. Scherer P. und H. Sahn 1979
Züchtung von Methanosarcina barkeri auf Methanol oder Acetat in einem definierten Medium.
In: 4. Symp. Techn. Mikrobiologie, Berlin; H. Dellweg (Ed.) Verlag Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie im Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Berlin. 281-290
66. Scherer P. and H. Sahn 1981
Influence of sulfur-containing compounds on the growth of Methanosarcina barkeri in a defined medium.
Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol. 12, 28-35
67. Scherer P. and H. Sahn 1981
Effects of trace elements and vitamins on the growth of Methanosarcina barkeri.
Acta Biotechnol. 1, 57-65
68. Schneider K. 1970
Turbidostatkultur von Chlorella für CO₂ - Gaswechsellmessungen.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, 527-535
69. Schnellen Ch. T. G. P. 1947
Onderzoekingen over de methaangistung.
Dissertation, Techn. Hoogeschool te Delft.
70. Smith M. R. and R. A. Mah 1978
Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol.
Appl. Environ. Microbiol. 36, 870-879

71. Smith M. R. and R. A. Mah 1980
Acetate as sole carbon and energy source for growth of Methanosarcina strain 227.
Appl. Environ. Microbiol. **39**, 993-999
72. Smith M. R., S. H. Zinder and R. A. Mah 1980
Microbial methanogenesis from acetate.
Process Biochemistry **15**, 34-39
73. Smith P. H. 1966
The microbial ecology of sludge methanogenesis.
Dev. Ind. Microbiol. **7**, 156-160
74. Soehngen M. N. L. 1906
Sur le role de methane dans la vie organique.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **29**, 238-273
75. Soehngen N. L. 1906
Waterstof en methan.
Doctoral Dissertation, Techn. Hoogeschool te Delft
76. Sowers K. R., M. J. Nelson and J. G. Ferry 1984
Growth of acetotrophic, methane - producing bacteria in a pH auxostat.
Curr. Microbiol. **11**, 227-230
77. Tanner R. S., E. Stackebrandt, G. E. Fox and C. R. Woese 1982
A phylogenetic analysis of Acetobacterium woodii, Clostridium butyricum, Clostridium lituseburense, Eubacterium limosum and Eubacterium tenue.
Curr. Microbiol. **5**, 35-38
78. Taylor G. T. 1982
The methanogenic bacteria.
Prog. Ind. Microbiol. **16**, 231-329
79. Touzel J. P., D. Petroff and G. Albagnac 1985
Isolation and characterization of a new thermophilic Methanosarcina, the strain CHTI 55.
Syst. Appl. Microbiol. **6**, 66-71
80. Traore A.S., CH. Gaudin, C. E. Hatchikian, J. LeGall and J. P. Belaich 1983
Energetics of growth of a defined mixed culture of Desulfovibrio vulgaris and Methanosarcina barkeri: Maintenance energy coefficient of the sulfate - reducing organism in the presence and absence of its partner.
J. Bacteriol. **155**, 1260-1264
81. Van Bruggen J. J. A., C. K. Stumm, K. B. Zwart and G. D. Vogels 1985
Endosymbiotic methanogenic bacteria of the sapropelic amoeba Mastigella.
FEMS Microb. Ecol. **31**, 187-192

82. **Vogels G. D. and C. M Vissier 1983**
Interconnection of methanogenic and acetogenic pathways.
FEMS Microbiol. Lett. **20**, 291-297
83. **Vogels G. D., C. van der Drift, C. K. Stumm, J. T. M Keltjens and K. B. Zwart 1984**
Methanogenesis: Surprising molecules, microorganisms and ecosystems.
Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. **50**, 557-567
84. **Wandrey C. and A. Aivasidis 1983**
*Continous anaerobic digestion with *Methanosarcina barkeri*.*
In: Biochemical Engineering III. Ann. of the NY Acad. Sci. **413**, 489-501
85. **Wellinger A. and K. Wuhrmann 1977**
*Influence of sulfide compounds on the metabolism of *Methanobacterium* strain AZ.*
Arch. Microbiol. **115**, 13-17
86. **Winter J. U. 1980**
Glucose fermentation to methane and CO₂ by defined mixed cultures.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig C **1**, 293-305
87. **Winter J. and R. S. Wolfe 1979**
*Complete degradation of carbohydrate to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*.*
Arch. Microbiol. **121**, 97-102
88. **Winter J. and R. S. Wolfe 1980**
*Methane formation from fructose by syntrophic associations of *Acetobacterium* and different strains of methanogens.*
Arch. Microbiol. **124**, 73-79
89. **Wolfe R. S. 1979**
Methanogens: a surprising microbial group.
Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. **45**, 353-364
90. **Wolfe R. S. and I. J. Higgins 1979**
Microbial biochemistry of methane - A study in contrasts.
Int. Rev. Biochem. Microbial Biochemistry (ed. J. R. Quayle) **21**, 267-300
91. **Wolin M. J. 1982**
Hydrogen transfer in microbial communities.
In: A.T. Bull and J. H. Slater (eds.): Microbial interactions and communities. Acad. Press, London; 323-356
92. **Wolin M. J. and T. L. Miller 1982**
Interspecies hydrogen transfer: 15 years later.
ASM News **48**, 561-565

93. **Zehnder A. J. B.** 1978
Ecology of methane formation.
In: R. Mitchell (ed., John Wiley & Sons, New York): Water pollution microbiology
Vol II, 349-376
94. **Zehnder A. J. B. and T. D. Brock** 1979
*Biological energy production in the apparent absence of electron transport and
substrate level phosphorylation.*
FEBS Lett. **107**, 1-3
95. **Zehnder A. J. B. and K. Wuhrmann** 1976
*Titanium(III)citrate as a nontoxic oxidation - reduction buffering system for the
culture of obligate anaerobes.*
Science **194**, 1165-1166
96. **Zeikus J. G.** 1983
Metabolism of one - carbon compounds by chemotrophic anaerobes.
Adv. Microbiol. Physiol. **24**, 215 - 299
97. **Zeikus J. G., P. J. Weimer, D. R. Nelson and L. Daniels** 1975
Bacterial methanogenesis: Acetate as a methane precursor in pure culture.
Arch. Microbiol. **104**, 129-134
98. **Zhilina T. N.** 1976
*Biotypes of *Methanosarcina*.*
Microbiology (USSR) **45**, 481-489
99. **Zinder ST. H.** 1984
*Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: Recent
developments.*
ASM News **50**, 294-298
100. **Zinder ST. H. and R. A. Mah** 1979
*Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to
use H_2 - CO_2 for methanogenesis.*
Appl. Environ. Microbiol. **38**, 996-1008

9. VERDANKUNGEN

Diese Arbeit entstand am Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich, Abteilung Mikrobiologie.

Herrn Prof. Dr. R. Bachofen danke ich herzlich für sein Interesse, für sein grosszügiges Entgegenkommen in der Beschaffung und Bereitstellung der Labor - Infrastruktur, sowie für die angenehme und persönliche Freiheit, die ich im Laufe der Tätigkeiten in seiner Abteilung erfahren durfte.

Herrn Dr. K. Schneider als meinem fachlichen Betreuer bin ich für die unentbehrliche technische Beratung und Mithilfe dankbar. Durch zahlreiche Diskussionen verhalf er mir zu einem Verständnis der verfahrenstechnischen Grundlagen. Ferner danke ich ihm für die Einführung in die Programmiersprachen BASIC, PASCAL und C.

Der schweizerische Nationalfonds unterstützte diese Untersuchungen im Rahmen des Projektes Nr. 3.520-0.83.

Herzlichen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mir mit ihrer Unterstützung und ihrem Wohlwollen diese Arbeit ermöglicht haben.

R. Bolliger, H. Brandl, E. Da Pra, H. P. Meister, P. Muster und R. Frei möchte ich für ihre kollegiale Unterstützung besonders danken. Sie haben mir durch angeregte Diskussionen geholfen, auftretende Probleme zu lösen.

Nicht zuletzt gehört mein Dank auch all den anderen Kommilitonen in der Abteilung Mikrobiologie für ihre Unterstützung.

CURRICULUM VITAE

Dubach, Albin Christian, Bürger von Sursee und Ruswil LU, geboren am 4. Februar 1955 in Sursee; Sohn von Walter Dubach und Anna Dubach, geb. Brun.

1967 - 1975	Kantonsschule in Sursee
1975	Matura Typus C in Sursee
1976 - 1986	Studium der Biologie an der Universität Zürich
1980 - 1981	Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. R. Bachofen und Dr. K. Schneider im Hauptfach Mikrobiologie
1981	Diplom in Mikrobiologie
1982 - 1986	Dissertation am Institut für Pflanzenbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. R. Bachofen und Dr. K. Schneider
1982 - 1986	Assistent am Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich

Vorlesungen und Kurse wurden besucht bei folgenden Dozenten und Assistenten:
F. W. Arndt, G. Bächli, R. Bachofen, E. Batschelet, J. Biegert, M. A. Billeter, A. Binder, M. Birnstiel, H. R. Bosshard, E. Brun, H. Burla, P. S. Chen, Ph. Christen, C. D. K. Cook, A. Dübendorfer, P. Endress, C. H. Eugster, R. Gächter, H. Gehring, K. Hanselmann, H. A. Hofstetter, H. R. Hohl, R. Honegger, R. Humbel, J. Kägi, F. Knüsel, H. Kummer, W. Kündig, K. Lerch, P. F. Meier, H. R. Oswald, R. Parish, R. Portmann, D. Rast, W. Reichart, H. Rieber, H. P. Ruffner, W. Schaffner, F. Schanz, H. Schächli, K. Schneider, P. Sonderegger, U. Straumann, W. Stumm, J. D. Tacier, E. Thomas, H. Wanner, R. Wehner, Ch. Weissmann, K. Wilson, A. Zehnder, V. Ziswiler.

